

MECHANISMUS DES SELBSTSCHUTZES

VON AMINOGLYKOSID-ANTIBIOTIKA PRODUZIERENDEN ACTINOMYCETEN

Wolfgang Piendl

Diss.
München
1986

MECHANISMUS DES SELBSTSCHUTZES
VON AMINOGLYKOSID-ANTIBIOTIKA PRODUZIERENDEN ACTINOMYCETEN

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wolfgang Piendl
aus
Regensburg

Mai 1984

1. Prüfer: Prof. Dr. A. Böck

2. Prüfer: PD Dr. W. Piepersberg

Tag der mündlichen Prüfung: 1. August 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Verwendete Bakterienstämme	11
2.2. Medien und Anzuchtbedingungen	12
2.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von Aminoglykosiden in vivo	12
2.4. Herstellung zellfreier Extrakte	13
2.4.1. Herstellung von S30 Rohextrakt	13
2.4.2. Herstellung von S100 und S100* Rohextrakt	13
2.5. Präparation von Ribosomen	14
2.5.1. Präparation von 70S Ribosomen	14
2.5.2. Präparation ribosomaler Unterein- heiten	14
2.6. Proteinsynthese in vitro	15
2.6.1. Poly(U)-System nach Cundliffe et al.	15
2.6.2. Heterologes Poly(U)-System	15
2.7. Rekonstitutionsversuche	17
2.7.1. Präparation von 16S rRNA	17
2.7.2. Präparation von Totalprotein aus 30S Ribosomen	18
2.7.3. Durchführung der 30S-Rekonstitution	18
2.8. Methylase-Tests	18

2.9.	Gleichgewichtsdialysen	19
2.10.	Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Auftrennung von ribosomalen Proteinen	19
2.11.	Zellwandanalyse von <i>Str. tenebrarius</i>	19
2.11.1.	Zellwandpräparation	19
2.11.2.	Qualitative und quantitative Analyse der Zellwand-Aminosäuren	20
2.11.3.	Analyse der Zellwandpolysaccharide	20
2.12.	Konzentrationsbestimmungen	20
2.12.1.	Proteinbestimmung	20
2.12.2.	Konzentrationsbestimmungen von Ribosomen und RNA	21
2.13.	Chemikalien und Antibiotika	21
3.	ERGEBNISSE	23
3.1.	Minimale Hemmkonzentrationen von Aminoglykosiden für Produzenten- und Vergleichsstämme	23
3.2.	Vorkommen von Aminoglykoside modifizierenden Enzymen in den Produzenten	27
3.3.	Optimierung des in vitro-Proteinsynthesystems	27
3.3.1.	Einfluß der Präparationsbedingungen von Rohextrakt und Ribosomen auf die Aktivität des Poly(U)-Systems	28
3.3.2.	Optimierung der Einzelkomponenten des Poly(U)-Systems	30
3.4.	Wirkung von Aminoglykosiden auf die Poly(U)-codierte Proteinsynthese und Bestimmung der für die Resistenz verantwortlichen Untereinheit	34
3.4.1.	Aminoglykoside produzierende Micromonospora-Arten	34

3.4.2.	Streptomyces tenjimariensis (Istamycin-Produzent)	39
3.4.3.	Streptomyces tenebrarius (Nebramycin-Produzent)	46
3.4.4.	Nocardia asteroides and Nocardia calcareo	52
3.5.	Totalkonstitution der 30S Untereinheit zur Be- stimmung der die Resistenz determinierenden ribosomalen Komponente	54
3.5.1.	Optimierung der Rekonstitutionsbe- dingungen - Vergleich der nativen und rekonstituierten 30S Partikel	54
3.5.2.	Effekt von Aminoglykosiden im Poly(U)- System auf homolog und heterolog re- konstituierte 30S Untereinheiten - Bestimmung der für die Resistenz ver- antwortlichen ribosomalen Komponente	56
3.6.	Ergebnisse der Methylierungsversuche	63
3.7.	Ergebnisse der Bindungsstudien	65
3.8.	Untersuchungen zur systematischen Stellung von Str. tenebrarius	66
3.8.1.	Zellwandanalyse	67
3.8.2.	Auswertung der Elektropherogramme ribosomaler Proteine	71
4.	DISKUSSION	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	87
6.	LITERATUR	89

Abkürzungen

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm Wellenlänge
AAC	Aminoglykosid-Acetyl-Transferase
APH	Aminoglykosid-Phospho-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
NRRL	ARC Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory
PPO	2,5-Diphenyloxazol
psi	pounds per inch ²
Poly(U)	Polyuridylsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TP30	Gesamtprotein der ribosomalen 30S Untereinheit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

Resistenz gegen ein Antibiotikum können Bakterien grundsätzlich über drei verschiedene Mechanismen erwerben, deren Existenz schon 1952 von Davis und Maas postuliert wurde (1):

- a) Das Antibiotikum wird enzymatisch so verändert, daß es seine antibakterielle Wirksamkeit verliert.
- b) Die Aufnahme des Antibiotikums ist blockiert oder stark reduziert.
- c) Der zelluläre Wirkort wird so verändert, daß das Antibiotikum nicht mehr daran binden kann.

Diese drei Mechanismen existieren, oft auch nebeneinander, bei Produzenten (2, 3) und sollen im folgenden hauptsächlich am Beispiel von Arten, die Aminoglykoside synthetisieren, kurz dargestellt werden.

Aminoglykoside modifizierende Enzyme, die zuerst als Plasmid-codierte Resistenzen in klinischen Isolaten beschrieben wurden, lassen sich in drei Gruppen untergliedern (4):

- a) Aminoglykosid-Acetyl-Transferasen (AAC) katalysieren den Transfer einer Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf eine Amino-Gruppe des Antibiotikums;
- b) Aminoglykosid-Phospho-Transferasen (APH), die am weitesten verbreitete Gruppe, phosphorylieren mit Hilfe von ATP eine Hydroxylgruppe;
- c) Aminoglykosid-Nukleotidyl-Transferasen (AAD) benützen ATP oder ein anderes Nukleotid zur Modifizierung einer Hydroxylgruppe.

Die einzelnen Enzyme sind charakterisiert durch das Spektrum von Aminoglykosiden, die als Substrat dienen können, sowie durch die Stellung der modifizierten Gruppe im Molekül. Im Gegensatz zu β -Lactamasen und Chloramphenicol-Acetyltransferasen inaktivieren diese Enzyme nicht das im Medium vorliegende Antibiotikum (5). Um den durch modifizierende Enzyme verliehenen Schutz zu verstehen, muß hier kurz auf das Aufnahmesystem der Aminoglykoside eingegangen werden. Nach einer energieunabhängigen, ionischen Bindung an die Zelloberfläche folgen zwei energieabhängige Aufnahmephasen, eine erste, sehr langsame (EDP I) und eine zweite, stark beschleunigte (EDP II), die durch Bindung des Aminoglykosids an Ribosomen gestartet wird (6). In Bakterien mit modifizierenden Enzymen findet nur der erste Aufnahmeschritt (EDP I) statt. Die Modifikationsrate ist aber ausreichend, um alles ins Cytoplasma gelangende Antibiotikum zu inaktivieren, so daß eine Bindung an Ribosomen nicht möglich ist. Somit kann die zweite schnelle Aufnahmephase (EDP II) nicht mehr initiiert werden (7, 8). Auch in Stämmen mit resistenten Ribosomen läßt sich dieser zweite Aufnahmeschritt nicht mehr nachweisen (9, 10).

Ein Vergleich von Enzymen, die Aminoglykoside inaktivieren, aus verschiedenen pathogenen Bakterien und den Produzenten-Stämmen begründete die These von Benveniste und Davies (11), die produzierenden Actinomyceten seien der genetische Ursprung der modifizierenden Enzyme in resistenten Krankheitserregern. Diese Annahme konnte in der jüngsten Zeit durch den Vergleich der Nukleotid-Sequenzen von Aminoglykosid-Phosphotransferase-Genen aus Streptomyceten und von Resistenz-Plasmiden bestätigt werden (12, 13).

Modifizierende Enzyme aus der Gruppe der Acetyl- und Phosphotransferasen stellen den wohl am verbreitetsten Resistenzmechanismus bei Aminoglykosid-Produzenten dar (Tabelle 1).

Tabelle 1: Aminoglykoside modifizierende Enzyme in Produzenten

Stamm	produziertes Antibiotikum	modifizierendes Enzym	Referenz
<i>Str. griseus</i>	Streptomycin	APH(6)	(14, 15)
<i>Str. bikiniensis</i>	Streptomycin	APH(6)	(16)
<i>Str. glaucescens</i>	Hydroxy-Streptomycin	APH(6)	(17)
<i>Str. kanamyceticus</i>	Kanamycin	AAC(6')	(11)
<i>Str. lividus</i>	Lividomycin	APH(3'), AAC(3)	(18)
<i>Str. fradiae</i>	Neomycin	APH(3'), AAC(3)	(19, 18)
<i>Str. albeogriseolus</i>	Neomycin	APH(3'), AAC(3)	(19, 18)
<i>Str. rimosus f. paromomycinus</i>	Paromomycin	APH(3')	(19)
<i>Str. ribosidificus</i>	Ribostamycin	APH(3'), AAC(3)	(19)
<i>Str. tenebrarius</i>	Tobramycin etc.	AAC(2')	(20, 21)
<i>Str. hygroscopicus</i>	Hygromycin B	APH	(22)
<i>M. chalybea</i>	Neomycin	APH(3'), AAC(3)	(18)
<i>B. circulans</i>	Butirosin	APH(3')	(23, 18)

Interessanterweise ist der Wirkort der Aminoglykoside, das Ribosom, bei den in Tabelle 1 aufgeführten Stämmen mit Ausnahme von *Str. tenebrarius* (21) sensitiv gegen das eigene Antibiotikum (24, 25, 26, 27).

Es war deshalb von Bedeutung, nachzuweisen, ob diese modifizierenden Enzyme allein in der Lage sind, die Hochresistenz der Produzenten zu gewährleisten, warum in manchen Stämmen zwei solche Enzyme vorliegen und ob weitere Mechanismen, zum Beispiel Membranveränderungen, für eine vollständige Resistenz gefordert werden müssen. Diese Fragen konnten zumindest für den

Neomycin-Produzenten *Str. fradiae*, der auch sensitive Ribosomen besitzt (27), beantwortet werden (28). Beide modifizierende Enzyme aus diesem Stamm (Tab. 1), die Phosphotransferase (APH 3') und die Acetyltransferase (AAC 3) inaktivieren Neomycin *in vitro*. Als DNA aus *Str. fradiae* in *Str. lividans* cloniert und auf Neomycin resistente Clone selektiert wurde, war es nicht erstaunlich, einige Clone mit Phosphotransferaseaktivität und andere mit Acetyltransferaseaktivität zu finden. Allerdings wiesen diese nur eine relativ niedrige Resistenz auf, obwohl die produzierte Enzymmenge nicht geringer war als in *Str. fradiae*. Erst Clone, die die Phosphotransferase und die Acetyltransferase enthielten, zeigten dieselbe Resistenzhöhe wie der Neomycin-Produzent, wodurch eindeutig belegt wurde, daß die Kombination aus beiden Enzymen die volle Resistenz ermöglicht.

Die Streptomycin-Produzenten *Str. bikiniensis* und *Str. griseus* sind während der exponentiellen Wachstumsphase sensitiv gegen Streptomycin, entwickeln eine hohe Resistenz erst kurz vor Beginn der Phase der Antibiotikumsproduktion (29, 14, 16). Die Phosphotransferase (APH 6') ist induzierbar und liegt während der Produktionsphase in hohen Konzentrationen vor (30). Es konnte auch gezeigt werden, daß dieses Enzym in der Lage ist, das Poly(U)-System mit sensitiven Ribosomen aus *Str. griseus* vor der hemmenden Wirkung von Streptomycin zu schützen (31, 32, 15). Auch bereits ans Ribosom gebundenes Streptomycin dient als Substrat für das Enzym, ein bereits blockiertes Poly(U)-System kann also durch Zugabe der Phosphotransferase wieder aktiviert werden.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß anscheinend während der Biosynthese des Streptomycins dieses intracellulär gar nicht auftritt. Streptomycin, dessen Biosynthese wohl von allen Aminoglykosiden am weitesten aufgeklärt ist (33, 34), tritt nur in der Form von antibakteriell nicht aktiven Vorstufen in der Zelle auf. Das vorletzte Enzym des Biosyntheseweges, die Dihydro-

streptomycin-Oxidoreduktase liegt membrangebunden vor (35), und erst dessen Produkt, Streptomycin-6-Phosphat, wird durch ein außen an der Zelloberfläche sitzendes Enzym zum aktiven Streptomycin dephosphoryliert (36).

Unter der großen Zahl von Actinomyceten, die gegen 70S Ribosomen gerichtete Antibiotika produzieren, wurden auch Spezies gefunden, deren Resistenz auf einer Veränderung des Wirkortes beruht, die also resistente Ribosomen besitzen. Der erste aus dieser Gruppe beschriebene Stamm war der Erythromycin-Produzent *Str. erythraeus*, dessen 50S ribosomale Untereinheit Erythromycin nicht mehr bindet (37). Als biochemische Grundlage für diese Resistenz wurde eine sekundäre Dimethylierung eines Adenylrestes der 23S rRNA beschrieben (38); auch die genaue Position dieser modifizierten Base in der 23S rRNA ist inzwischen bestimmt (39). Ähnliche, zum Teil auch induzierbare Resistenzmechanismen wurden in anderen MLS-Antibiotika (Macrolide, Lincosamide und Streptogramine) produzierenden Streptomyceten gefunden (40, 41). Schon früher war in klinischen Isolaten von Staphylococcen beobachtet worden, daß die Resistenz gegen MLS-Antibiotika durch Erythromycin induziert werden kann, und daß diese Stämme über eine Plasmid-codierte 23S rRNA-Methylase verfügen (42, 43).

Ebenfalls sehr detailliert untersucht ist der Resistenzmechanismus von *Str. azureus*, der das modifizierte Peptid-Antibiotikum Thiostrepton synthetisiert. Die Methylierung einer Base der 23S rRNA macht das Ribosom vollständig resistent gegen Thiostrepton (44), das Produkt dieser Methylierung ist 2'-O-Methyladenosin (45) in Position 1067 der 23S rRNA (von *E. coli*; 46).

Der gegenteilige Effekt, das Fehlen der normalen Dimethylierung zweier benachbarter Adenin-Reste in der 16S rRNA bei *E. coli* verleiht übrigens Resistenz gegen Kasugamycin (47, 48).

In den letzten Jahren wurden auch einige Aminoglykosid-Produzenten beschrieben, die sich durch eine ribosomale Resistenz

gegen die eigenen Antibiotika schützen. Der Gentamicin-Produzent *M. purpurea*, in dem schon Benveniste und Davies (11) keine modifizierenden Enzyme nachweisen konnten, ist konstitutiv hoch resistent gegen alle 4,6-disubstituierten Deoxystreptamin-Derivate aufgrund einer ribosomalen Resistenz (49). In Untereinheiten-Austauschexperimenten zwischen *M. purpurea* und dem sensitiven Vergleichsstamm *M. melanospora* konnte gezeigt werden, daß die 50S Untereinheit keinen wesentlichen Einfluß auf den Resistenzcharakter des Ribosoms hat - gemessen wurden Hemmung und durch Gentamicin induziertes Misreading im Poly(U)-System -, und daß eine nicht bestimmte Veränderung der 30S Untereinheit des Produzenten allein also die Hochresistenz determiniert.

Ebenfalls keine Aminoglykoside modifizierende Aktivität besitzt *Str. tenjimariensis*, der Istamycin-Produzent; die hohe Resistenz gegen eine Reihe von Aminoglykosiden ist ribosomaler Natur (50, 51). Da diese Ribosomen zwar gegen Kanamycin, nicht aber gegen Gentamicin (21) resistent sind, muß in diesem Stamm ein anderer Resistenzmechanismus vorliegen als in *M. purpurea*.

Str. tenebrarius produziert den Nebramycin-Komplex, der aus Kanamycin B und Derivaten davon (hauptsächlich Tobramycin) und Apramycin besteht. In diesem Stamm, der gegen alle Aminoglykoside hoch resistent ist (52), konnten zum ersten Mal neben der ribosomalen Resistenz auch (mindestens) zwei Aminoglykoside modifizierende Enzyme nachgewiesen werden (21). Das ribosomale Resistenzprofil glich dem von *M. purpurea*. Wie bei *Str. tenjimariensis* war auch hier nicht untersucht worden, welche Untereinheit oder ribosomale Komponente die Resistenz bestimmt.

Der jüngste Bericht über eine ribosomale Aminoglykosid-Resistenz stammt von Nakano et al. (53). Bei dem Versuch, die Acetyltransferase aus dem Kanamycin-Produzenten *Str. kanamyceticus* (11) in *Str. lividans* zu klonieren, erhielten die Autoren Transformanten, die - völlig unerwartet - eine ribosomale Kanamycin-

Resistenz aufwiesen. Diese tritt in *Str. kanamyceticus* nur auf, wenn der Organismus Kanamycin produziert, ist also induzierbar, während unter Nicht-Produktionsbedingungen *Str. kanamyceticus* sensitive Ribosomen und eine konstitutive Aminoglykosid-Acetyltransferase hat. Das ribosomale Resistenzspektrum ist mit dem von *M. purpurea* identisch, auch hier ist die kleinere ribosomale Untereinheit der resistenzbestimmende Teil (H. Mashiko, persönliche Mitteilung).

Solche Ribosomen aus Antibiotika produzierenden Bakterien, die gegen eine Reihe von Deoxystreptamin-Aminoglykosiden hoch resistent sind, können sicher auch dazu beitragen, die Bindeorte dieser Antibiotika am Ribosom und ihre genaue Wirkungsweise besser zu charakterisieren. Mit Ausnahme von Kasugamycin und Spectinomycin, die bakteriostatisch wirken und auf die im folgenden auch nicht mehr weiter eingegangen werden soll, sind die Aminoglykoside bakterizid. Sie sind aber weder von der Struktur (54) noch von der Wirkweise her als einheitliche Gruppe aufzufassen. Die nach ihrer Bedeutung in der klinischen Anwendung oder wegen ihrer detailliert untersuchten Wirkungsmechanismen wichtigsten Aminoglykoside lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- a) Die erste Gruppe besteht aus Substanzen, die einen Streptidin-Anteil enthalten. Streptomycin ist hier der bedeutendste Vertreter.
- b) Die zweite Klasse besitzt einen 2-Deoxystreptamin-Rest, der in 4,5-Stellung (Neomycin, Paromomycin, Lividomycin A) oder in 4,6-Stellung (Gentamicin, Kanamycin, Sisomicin) substituiert ist.
- c) In die dritte Gruppe sind Aminoglykoside einzuordnen, die aufgrund ihrer ausgefallenen Strukturen (Apramycin, Hygromycin B) nicht in die ersten beiden Gruppen passen.

Die hemmende Wirkung der Aminoglykoside auf Initiation und

Elongation der Proteinsynthese sowie das durch sehr viele Aminoglykoside induzierte Misreading, das heißt der Einbau von Aminosäuren, die nicht dem jeweiligen mRNA-Codon entsprechen (55), sind pleiotrophe Effekte, die auf die Wechselwirkung des Antibiotikums mit dem Ribosom zurückzuführen sind.

Die meisten biochemischen Untersuchungen zur Wirkung der Aminoglykoside wurden an Streptomycin durchgeführt, das lange als typisch für alle Aminoglykoside galt. Neuere Arbeiten zeigten jedoch, daß grundsätzliche Unterschiede zum Aktionsmechanismus der disubstituierten 2-Deoxystreptamine bestehen. Streptomycin bindet an 70S Ribosomen und mit geringerer Affinität an die 30S Untereinheit in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 bei Konzentrationen bis 10 μ M (56, 57) und beeinflusst hauptsächlich die Initiation (58, 59). R17-RNA-codierte Polypeptidsynthese wird monophasisch gehemmt und Misreading wird induziert, allerdings nur bis zu einem bestimmten Niveau, das mit vollständiger Besetzung der Bindestelle erreicht wird und auch durch höhere Streptomycin-Konzentrationen nicht mehr verändert wird (60). Eine Mutation in einem Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit, S12, das Streptomycin alleine nicht bindet, führt zur Hochresistenz des Ribosoms (61). Gorini und Mitarbeiter (62, 63) zeigten, daß auch die 16S rRNA eine Komponente der Bindestelle von Streptomycin darstellt.

Die Art des Misreadings und der Hemmung der Polypeptidsynthese, die durch Deoxystreptamin-Aminoglykoside wie Gentamicin, Kanamycin und Neomycin induziert werden, sowie die Tatsache, daß keine hochresistenten ribosomalen Einschnitt-Mutanten gefunden wurden, führten zu der Annahme, daß diese Antibiotika über zwei oder mehr Bindungsstellen am Ribosom verfügen. Misumi et al. (64) kamen nach Bindungsstudien mit 3 H-Kanamycin zu dem Ergebnis, daß Kanamycin an beide ribosomale Untereinheiten mit etwa gleicher Affinität bindet, bei höheren Antibiotikumskonzentrationen aber weitere Stellen besetzt. Neomycin und in etwas ge-

ringerem Maße Gentamicin, nicht jedoch Streptomycin, kompetieren wie unmarkiertes Kanamycin, was auf identische Bindestellen für diese Antibiotika hindeutet. Le Goffic et al. (65) untersuchten in Gleichgewichtsdialysen die Bindung von ^3H -Tobramycin und postulierten zwei Arten selektiver Bindungsstellen an 70S und 50S Ribosomen, aber nur einen Bindungstyp an der 30S Untereinheit.

Die Aminoglykoside der Gentamicin-Kanamycin-Neomycin-Gruppe zeigen im Gegensatz zu Streptomycin einen "triphasischen" Effekt im Hinblick auf die Hemmung der Proteinsynthese und die Induktion von Misreading (66, 67, 68, 69). Bei niedrigen Antibiotikumskonzentrationen wird die Proteinsynthese gehemmt, aber nur ein geringes Misreading induziert; bei steigenden Konzentrationen wird die Hemmung teilweise wieder aufgehoben, aber die Fehleinbaurate drastisch erhöht; erst bei sehr hohen Konzentrationen tritt wieder vollständige Hemmung ein. Dieser triphasische Effekt, der sowohl in initiiierenden als auch in rein elongierenden in vitro Systemen zu beobachten ist (67, 69), wurde wiederum mit verschiedenen Bindungsstellen am Ribosom erklärt (66).

Auch die wenigen näher untersuchten Mutanten, die gegen Aminoglykoside dieser Gruppe resistent sind, weisen Veränderungen in beiden ribosomalen Untereinheiten auf. Als Beispiel seien die von Choi et al. (70) beschriebenen, Kanamycin-Resistenz determinierenden Veränderungen der 30S oder 50S Untereinheit genannt. Ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit, L6, ist in einer Gentamicin-resistenten Mutante verändert, die reduziertes Misreading zeigt (68). Es ist aber darauf hinzuweisen, daß diese Mutationen weder eine Hochresistenz des Ribosoms noch der Bakterien in vivo bewirken. Bei hochresistenten Mutanten liegt meist neben einer ribosomalen Mutation ein Defekt im Aufnahmesystem vor (9, 71).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun zuerst in einer Reihe

von Untereinheiten-Austauschexperimenten geklärt werden, ob auch die ribosomale Resistenz von *Str. tenebrarius* und *Str. tenjimariensis* sowie den Aminoglykoside produzierenden *Microspora*-Arten (Tab. 2) ebenso wie bei *M. purpurea* allein durch die 30S Untereinheit determiniert wird.

Basierend auf dem Ergebnis, daß bei allen untersuchten Produzentenstämmen nur die 30S Untereinheit für die ribosomale Resistenz verantwortlich ist, war als nächster Schritt in Rekonstitutionsexperimenten zu untersuchen, welche Komponente des Ribosoms - Protein oder 16S rRNA - die Resistenzeigenschaft bestimmt. Das Ergebnis, daß eine Eigenschaft der 16S rRNA die Resistenz des Ribosoms determiniert, während ribosomale Proteine keinerlei Einfluß darauf haben, ist überraschend und läßt die Wirkung der Aminoglykoside am Ribosom in einem neuen Licht erscheinen. Bisher analysierte Aminoglykosid-resistente oder auch -abhängige Mutanten von Laborstämmen wiesen nämlich stets Veränderungen in einzelnen Proteinen der kleinen Untereinheit, zum Beispiel S5, S8 und S12, oder auch in Protein L6 der großen Untereinheit auf (72).

Da während der Arbeiten mit *Str. tenebrarius* Zweifel an seiner Zuordnung zur Gattung *Streptomyces* auftauchten, sollte seine systematische Stellung durch die Untersuchung des Zellwandaufbaus weiter geklärt werden, um so auch eine Aussage über die Verbreitung von ribosomalen Resistenzmechanismen bei Aminoglykosid-Produzenten innerhalb verschiedener Bakteriengruppen treffen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm		produziertes Antibiotikum	Referenz
<i>Micromonospora grisea</i>	NRRL 3800	Verdamycin	(73)
<i>Micromonospora inyoensis</i>	ATCC 27600	Sisomicin	(73)
<i>Micromonospora purpurea</i>	DSM 43036	Gentamicin	(73)
<i>Micromonospora rhodorangea</i>	NRRL 5326	Antibiotikum G-418	(73)
<i>Micromonospora sagamiensis</i> subsp. non reducans	ATCC 21949	Sagamycin	(73)
<i>Micromonospora zionensis</i>	NRRL 5466	Antibiotikum G-52	(73)
<i>Micromonospora melanosporea</i>	DSM 43126	-	(99)
<i>Nocardia asteroides</i>	DSM 43063 ^a	-	
<i>Nocardia calcarica</i>	DSM 43065 ^{a,b}	-	
<i>Streptomyces tenebrarius</i>	NCIB 11028 =ATCC 17921	Nebramycin	(52)
<i>Streptomyces tenji-</i> <i>mariensis</i>	ATCC 31603	Istamycin	(74)
<i>Streptomyces lividans</i>	TK 21	-	(75)
<i>Escherichia coli</i>	K12 C600	-	(76)

a: nicht im Katalog der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen verzeichnet

b: nach neueren Untersuchungen in die Gattung *Rhodococcus* einzuordnen (Dr. Kroppenstedt, persönliche Mitteilung)

2.2. Medien und Anzuchtbedingungen

Alle Micromonospora-Arten wurden in einem von Benveniste und Davies (11) beschriebenen Vollmedium folgender Zusammensetzung angezogen:

0.3 %	Fleischextrakt
0.5 %	Hefeextrakt
0.5 %	Trypton
0.1 %	Glukose
2.4 %	Stärke
0.6 %	CaCO ₃
0.4 %	KCl

TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid CM 129, 30 g/l) diente als Anzuchtmedium für Streptomyces und Nocardia.

Zur Anzucht von E. coli wurde TYGES (1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.2 % Glukose, 0.5 % NaCl) verwendet.

Die Anzucht der Actinomyceten erfolgte in 2 l-Erlenmeyerkolben, die 500 ml Medium enthielten, bei 30°C unter sehr guter Belüftung. Für E. coli betrug die Inkubationstemperatur 37°C. Die Zellen wurden in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

2.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von Amino-glykosiden in vivo

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen erfolgte für Streptomyces und Nocardia auf TSB-Agar (7.5 ml Agar in kleinen Petrischalen) beziehungsweise für Micromonospora auf Vollmediumplatten nach Benveniste und Davies. Eine Öse voll Sporensuspension (Str. lividans, Str. tenjimariensis) oder Mycelsuspension (Micromonospora, Nocardia) im jeweiligen Medium wurde auf die Platten mit verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen ausgestrichen. Nach einer Inkubation von drei bis fünf Tagen bei 30°C wurde das Wachstum notiert.

2.4. Herstellung zellfreier Extrakte

2.4.1. Herstellung von S30 Rohextrakt

Zur Entfernung von den an die Zellwand gebundenen Proteasen wurden die Zellen zweimal in Puffer A (10 mM Tris/Cl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 M KCl, 6 mM β -Mercaptoäthanol) und einmal in Puffer B (10 mM Tris/Cl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 6 mM β -Mercaptoäthanol) gewaschen und anschließend im jeweiligen Aufnahmepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von DNase I, Grad II, in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml wurden die Zellen über eine zweimalige Passage durch die French Press Zelle bei 10 000 psi aufgebrochen. Das Zelldebris wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 30 000 g abgetrennt. Der S30 Extrakt wurde, soweit er nicht sofort weiter verarbeitet wurde, nach zwei- bis 4-stündiger Dialyse gegen den Aufnahmepuffer in kleine Mengen portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70^\circ C$ aufbewahrt.

2.4.2. Herstellung von S100 und S100* Rohextrakt

Ribosomenfreier S100 Extrakt wurde durch Zentrifugation des S30 Rohextraktes (3 h bei 100 000 g) gewonnen. Als S100* wird ein ribosomenfreier Zelleextrakt bezeichnet, der außer allen löslichen Proteinen des S100 Extrakts auch noch die Proteine enthält, die man durch Waschen von Ribosomen mit 1 M NH_4Cl erhält.

Zur Herstellung von S100* wurde 1 Volumen S30 Rohextrakt auf ein Volumen 20%ige Saccharose in 20 mM HEPES/KOH pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 1 M NH_4Cl und 6 mM β -Mercaptoäthanol aufgelagert und 4 h bei 100 000 g zentrifugiert. Die oberen drei Viertel wurden aus dem Zentrifugenbecher abgezogen und im Normalfall zweimal gegen Puffer C (10 mM HEPES/KOH pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl , 6 mM Mercaptoäthanol) dialysiert.

S100 und S100* wurden, wie für S30 Rohextrakt beschrieben, portioniert und aufbewahrt.

2.5. Präparation von Ribosomen

2.5.1. Präparation von 70S Ribosomen

S30 Rohextrakt in TMNSH (10 mM Tris/Cl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NH_4Cl , 6 mM β -Mercaptoäthanol) wurde auf ein gleiches Volumen 20%ige Saccharose in TMNSH aufgelagert und 4 h bei 45 000 Upm zentrifugiert. Das resultierende Ribosomensediment wurde einmal mit TMNSH gewaschen, die Ribosomen wurden im selben Puffer resuspendiert, portioniert und schockgefroren.

2.5.2. Präparation ribosomaler Untereinheiten

Um eine vollständige Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten zu erreichen, wurden die Zellen vor der Ernte einer "run-off-Behandlung" unterzogen, das heißt bei 10°C im Wasserbad 15 min geschüttelt. S30 Rohextrakt in Dissoziationspuffer (20 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl, 6 mM β -Mercaptoäthanol) wurde mindestens 2 h gegen diesen Puffer dialysiert, auf 10- bis 30%ige Saccharosegradienten in Dissoziationspuffer (~100 A_{260} /Gradient) aufgetragen und 85 min bei 40 000 Upm im TV 850 Vertikalrotor bei 4°C (Str. tenejimariensis bei 15°C) zentrifugiert. Das Absorptionsprofil der Gradienten bei 260 nm wurde in einer Durchflußzelle eines Gilford-Spektralphotometers aufgenommen und die 30S- und 50S-Material enthaltenen Fraktionen gesammelt. Die Untereinheiten wurden - nach Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration auf 10 mM - 6 h bei 45 000 Upm abzentrifugiert. Die 50S Untereinheiten wurden anschließend sofort in TMNSH aufgenommen; die 30S Untereinheiten wurden dagegen einmal in Hochsalzpuffer (20 mM Tris/Cl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 M NH_4Cl , 6 mM β -Mercaptoäthanol) gewaschen und dann in TMNSH aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

Untereinheiten, die zur Präparation ribosomalen Proteins bestimmt waren, wurden direkt in einem Puffer mit 20 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 mM $MgCl_2$, 1 M NH_4Cl , 6 mM β -Mercaptoäthanol aufgetrennt (95 min 40 000 Upm in TV 850, 4°C).

2.6. Proteinsynthese in vitro

2.6.1. Poly(U)-System nach Cundliffe et al.

Die Tests auf Antibiotika-Sensitivität der rekonstituierten 30S Untereinheiten von *Micromonospora* wurden in einem Poly(U)-abhängigem Polyphenylalaninsynthesensystem durchgeführt, das mit Ausnahme einiger Modifikationen auf die Arbeit von Cundliffe et al. (77) zurückgeht.

Die Standardprobe dieses Systems hatte ein Volumen von 50 μ l und enthielt folgende Komponenten: 20 mM HEPES/KOH pH 7.4; 150 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$; 0.375 mM GTP und 2.5 mM ATP, beide mit KOH auf pH 7.5 eingestellt; 5 mM Phosphoenolpyruvat, Trinatriumsalz; 2.5 μ g Pyruvatkinase; 0.025 U tRNA^{Phe}; 25 μ g Poly(U); 0.01 mM L-(U-¹⁴C)Phenylalanin (508 mCi/mMol); 2.5 % bis 10 % S100* von *Micromonospora melanosporea*; 0.065 A₂₆₀ $\hat{=}$ 3 pMol 50S Ribosomen; 0.07 bis 0.21 A₂₆₀ = 6 bis 18 pMol 30S Ribosomen. Von jeder S100*-Präparation sowie von den rekonstituierten 30S Partikeln wurden in Vorversuchen die optimalen Konzentrationen ermittelt. Die Ansätze wurden 60 min bei 30°C inkubiert, wobei in bestimmten Intervallen 10 μ l-Proben entnommen und sofort in 1 ml 5%ige TCA pipettiert wurden. Um die RNA zu hydrolysieren, wurden die Proben 20 min gekocht; das präzipitierte Material wurde auf Glasfaserfiltern gesammelt, viermal mit 5%iger TCA gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

2.6.2. Heterologes Poly(U)-System

Normalerweise wurden die in-vitro-Antibiotikatests in einem Poly(U)-System durchgeführt, das ursprünglich auf Rosset und Gorini^e (78) zurückgeht und von uns (49) für *Micromonospora* adaptiert wurde. Dieses System enthielt im Standardansatz (125 μ l Gesamtvolumen) folgende Komponenten: 50 mM Tris/Cl pH 7.5; 75 mM NH_4Cl ; 12 mM $MgCl_2$; 5 mM β -Mercaptoäthanol; 0.1 mM GTP; 1 mM ATP; 6 mM Phosphoenolpyruvat; 2 μ g Pyruvatkinase; 50 μ g tRNA aus *E. coli*; 40 μ g Poly(U); 0.015 mM

L-(U- ^{14}C)Phenylalanin ($10\ \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$); 2 A₂₆₀ 70S Ribosomen oder 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten; 75 μg S100 Totalprotein aus E. coli.

Um Ribosomen zu sparen und um eine höhere Aktivität zu erzielen, wurde dieses System weiter optimiert, wobei folgende Komponenten verändert wurden: die spezifische Radioaktivität des ^{14}C Phenylalanins wurde auf $100\ \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ erhöht, gesenkt wurde der tRNA-Gehalt auf 25 μg , das S100 Totalprotein auf etwa 20 μg sowie die Konzentration der 50S auf 0.2 A₂₆₀ (9.2 pMol) und der 30S Untereinheit auf 0.15 A₂₆₀ (13 pMol) pro Testansatz.

Wenn anstelle des S100 Extraktes aus E. coli homologer Rohextrakt aus Micromonospora oder Streptomyces eingesetzt wurde, wurde der Tris-Puffer durch 50 mM HEPES/KOH pH 7.5 ersetzt.

Zur Bestimmung des Misreadings, also des Fehleinbaus von Aminosäuren, wurde im obigen Testsystem ^{14}C -Phenylalanin durch folgendes Aminosäuregemisch ersetzt: ^{12}C -Phenylalanin, ^{14}C -Serin, ^{14}C -Isoleucin und ^{14}C -Tyrosin in der Endkonzentration von je 0.015 mM, die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Aminosäuren betrug je $10\ \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ beziehungsweise $100\ \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$ im optimierten System.

Die Inkubationszeit betrug normalerweise 45 min bei 30°C. Die Proben wurden dann in Eis gestellt, mit 1 ml 5%iger TCA versetzt, 20 min gekocht, und das präzipitierte Material auf Schleicher & Schüll Glasfaserfiltern Nr. 6 gesammelt. Die Filter wurden dreimal mit je 5 ml 5%iger TCA und einmal mit 5 ml 70%igem Äthanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität in einem Gemisch aus Toluol und 0.5 % PPO im Szintillationszähler bestimmt.

Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit allen Komponenten ohne Inkubation gleich mit 5%iger TCA versetzt. Außerdem wurde

jede S100-Präparation (ohne zugesetzte Ribosomen) sowie auch alle Untereinheiten-Präparationen (ohne Zugabe der entsprechenden anderen Untereinheit) auf Restaktivität kontrolliert.

2.7. Rekonstitutionsversuche

Die 30S Untereinheiten, aus denen 16S rRNA und ribosomales Protein präpariert wurde, waren immer mit 1 M NH_4Cl gewaschen und im Poly(U)-Test auf Aktivität geprüft worden.

2.7.1. Präparation von 16S rRNA

Im Poly(U)-System auf Aktivität getestete 30S Untereinheiten wurden mit TMNSH auf 50 A_{260}/ml verdünnt. Die Lösung wurde auf 1 % NaCl und 0.1 % SDS gebracht, mit dem gleichen Volumen Phenol (redestilliert, wassergesättigt) versetzt und 1 h bei 0°C gerührt. Um auch letzte Spuren von Protein zu entfernen, wurde die wässrige Phase einer weiteren Phenol-Extraktion, allerdings ohne Zugabe von SDS, unterworfen. Aus dem Überstand wurde die 16S rRNA durch Zugabe von zwei Volumina kalten Äthanol ausgefällt (-20°C , mindestens 3 h). Das Präzipitat wurde sedimentiert und getrocknet, anschließend in RNA-Puffer (10 mM Tris/Cl, pH 7.6, 0.2 mM MgCl_2) gelöst. Die Äthanol-fällung wurde zur Entfernung von restlichem Phenol einmal wiederholt, die RNA in RNA-Puffer aufgenommen und in kleinen Portionen bei -70°C aufbewahrt.

Die bei der Proteinextraktion anfallende, durch 2 M LiCl/4 M Harnstoff präzipitierte 16S rRNA wurde in RNA-Puffer gelöst und mehrmals gegen diesen Puffer dialysiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurde für alle Versuche mit Phenol extrahierte RNA verwendet.

Jede 16S rRNA-Präparation wurde in einem vollständig denaturierendem Gelelektrophorese-System (79) auf Strangbrüche geprüft.

2.7.2. Präparation von Totalprotein aus 30S Ribosomen

Zu 30S Untereinheiten in TMNSH (150 - 300 A₂₆₀/ml) wurde ein gleiches Volumen 4 M LiCl/8 M Harnstoff gegeben. Dieses Extraktionsgemisch wurde 48 h in Eis stehengelassen. LiCl und Harnstoff wurden stets frisch gelöst und 1 h mit Bentonit gerührt.

Die präzipitierte RNA wurde abzentrifugiert, der Überstand in Dialyseschläuchen Spectrapor Nr. 3 dreimal gegen 30 mM Tris/Cl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 1 M KCl, 6 mM β -Mercaptoäthanol dialysiert. Visking-Dialyse-Schläuche waren ungeeignet, da während der Dialyse Protein verlorenging.

2.7.3. Durchführung der 30S-Rekonstitution

Die Rekonstitutionen der 30S Untereinheit wurden nach der von Traub und Nomura (80) publizierten Methode durchgeführt. 5 bis 20 A₂₆₀ 16S rRNA und 1.5 bis 2 A₂₆₀-Äquivalente TP30 (jeweils frisch präpariert) wurden in Rekonstitutionspuffer (30 mM Tris/Cl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 292 mM KCl, 6 mM β -Mercaptoäthanol) 20 min bei 40°C inkubiert. Die 16S rRNA-Konzentration betrug 2 bis 3 A₂₆₀/ml. Die rekonstituierten Partikel wurden 4 h bei 150 000 g abzentrifugiert und in TMNSH aufgenommen.

2.8. Methylase-Tests

16S rRNA methylierende Enzyme sollten in einem Ansatz, der dem Test auf Methylasen der 23S rRNA analog war (81), nachgewiesen werden. Der Test-Ansatz (0.1 ml Gesamtvolumen) enthielt 50 mM HEPES/KOH pH 7.6, 10 mM KCN, 10 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 3 mM β -Mercaptoäthanol, 2.5 μ Ci (Methyl-³H) SAM (500 μ Ci/ μ Mol), Totalprotein als S30 oder S100* Rohextrakt und 40 pMol eines der folgenden Substrate: 30S Ribosomen, 2 M LiCl core-30 Partikel, 1 M LiCl core-30 Partikel, 0.5 M LiCl core-30 Partikel oder 16S rRNA. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. 20 μ l-Proben wurden in Intervallen bis 20 min entnommen, in 1 ml

eiskalte 5%ige TCA pipettiert und 30 min bei 0°C stehen gelassen. Das präzipitierte Material wurde auf Glasfaserfiltern Nr. 6 (Schleicher & Schüll) gesammelt und fünfmal mit kalter 5%iger TCA nachgewaschen.

Die Präparation der LiCl core-30 Partikel erfolgte nach Dijk und Littlechild (82).

2.9. Gleichgewichtsdialysen

Die Durchführung der Gleichgewichtsdialysen zur Untersuchung der Bindung von Gentamicin an Ribosomen erfolgte nach der Vorschrift von Böck et al. (83). Getestet wurden 30S, 50S und 70S Ribosomen von *M. melanosporea* und von *M. purpurea*. Es wurden 15 A₂₆₀ 70S, 10 A₂₆₀ 50S und 5 A₂₆₀ 30S/Kammer eingesetzt. Der Konzentrationsbereich des ³H-Gentamicin-Sulfats erstreckte sich von 0.5 bis 40 µM.

2.10. Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Auftrennung von ribosomalen Proteinen

Die Extraktion der ribosomalen Proteine aus mit 1 M NH₄Cl gewaschenen Untereinheiten erfolgte nach der von Hardy et al. (84) beschriebenen Methode. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der ribosomalen Proteine wurde nach der Vorschrift von Geyl et al. (85) durchgeführt. Dabei wurden 80 µg Protein der 30S Untereinheit und 120 µg Protein der 50S Untereinheit aufgetragen.

2.11. Zellwandanalyse von *Str. tenebrarius*

2.11.1. Zellwandpräparation

Zellen der späten logarithmischen Phase wurden vor der Ernte zur Inaktivierung autolytischer Enzyme 15 min im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte in einer Bühler-Zellmühle. Die Zellwände wurden nach den üblichen

Methoden (86) präpariert und durch tryptische Verdauung gereinigt (0.5 mg/ml Trypsin in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.8 unter Toluolzusatz, 12 h, 37°C).

2.11.2. Qualitative und quantitative Analyse der Zellwand-Aminosäuren

Zur vollständigen Hydrolyse der tryptisch gereinigten Zellwände wurden 3 mg Zellwand mit 0.3 ml 4 N HCl in zugeschmolzenen Fiolax-Röhrchen 16 h bei 100°C inkubiert. Nach Entfernung der HCl wurden die Hydrolysate in Probenverdünnungspuffer pH 2.2 gelöst. 50 µl-Proben ($\approx$ 25 µg) wurden mit Hilfe eines Aminosäureanalysators (Biotronik LC 6001) qualitativ und quantitativ untersucht.

Die Konfiguration der Diaminopimelinsäure wurde nach der Methode von Rhuland et al. (87) chromatographisch bestimmt, wobei DL- α,ϵ -Diaminopimelinsäure von Sigma und Zellwand-Totalhydrolysat von *Arthrobacter simplex* NCIB 8929 (88) als Referenzen dienten.

2.11.3. Analyse der Zellwandpolysaccharide

Die Komponenten der Zellwandpolysaccharide wurden nach saurer Hydrolyse (2 N HCl, 100°C, 3 h) und anschließender Reduzierung und Acetylierung (89) beziehungsweise nach HF-Hydrolyse (90) mit oder ohne zwischengeschalteter saurer Hydrolyse und darauf folgender Reduzierung und Acetylierung gaschromatisch identifiziert. Zur Auftrennung diente 3 % SP 2340 auf Supelcoport in einer Glassäule (700 x 2 mm) in einem Packard Gaschromatographen, Modell 428, mit einem Temperaturprogramm von 140 bis 270°C (6°C Steigerung/min).

2.12. Konzentrationsbestimmungen

2.12.1. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden spektrophotometrisch nach der

Methode von Ehresmann et al. (91) bestimmt. Auch für Streptomyceten-Rohextrakte ließ sich diese Methode anwenden, wie Vergleiche mit der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (92) zeigten.

2.12.2. Konzentrationsbestimmungen von Ribosomen und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und Ribosomen wurde ihre spezifische Absorption bei 260 nm bei Verdünnungen von A_{260} zwischen 0.1 und 0.5 gemessen. Dabei wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

1 A_{260}	70S Ribosomen	≅	29.4 pmol
1 A_{260}	50S Ribosomen	≅	46.2 pmol
1 A_{260}	30S Ribosomen	≅	87 pmol
1 A_{260}	16S RNA	≅	87 pmol ≅ 42 µg

2.13. Chemikalien und Antibiotika

Die Radiochemikalien L-(U- ^{14}C)-Isoleucin, L-(U- ^{14}C)-Phenylalanin, L-(U- ^{14}C)-Serin, L-(U- ^{14}C)-Tyrosin wurden von Radiochemical Centre, Amersham, bezogen.

Poly(U), Phosphoenolpyruvat $\cdot \text{Na}_3$, tRNA^{Phe} und Pyruvatkinase waren Produkte der Firma Boehringer, Mannheim.

Sämtliche anderen verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A.

Die Bezugsquellen der Antibiotika sind jeweils in Klammern aufgeführt: Gentamicin-Sulfat, C-Komplex, Amikacin (Sigma Chemical Co., St. Louis); Gentamicin C_1^- , C_{1a}^- und C_2^- -Sulfat, Netilmicin-Sulfat, Antibiotikum G-418 (Schering Corp., Bloomfield, N.Y.); Kanamycin-Sulfat, Neomycin-Sulfat, Streptomycin-Sulfat (Serva, Heidelberg); Sisomicin-Sulfat (Bayer, Elberfeld); Sagamicin (Kyowa Hakko Co., Tokyo); Hygromycin B (Biogal Corp., Debrecen, Ungarn); Tobramycin, Apramycin (Eli Lilly & Co., Indianapolis); Lividomycin A-Sulfat (Laboratoire R. Bellon,

Neuilly-sur-Seine); Kasugamycin · HCl (Bristol Laboratories, Syracuse, N.Y.); Paromomycin-Sulfat (Roussel Uclaf, Paris); Spectinomycin (Mycofarm, Delft).

3. ERGEBNISSE

3.1. Minimale Hemmkonzentrationen von Aminoglykosiden für Produzenten- und Vergleichsstämme

Aus den im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführten Untersuchungen am Gentamicin-Produzenten *M. purpurea* (49) war bekannt, daß eine vollständige Korrelation zwischen in vivo Resistenz gegen eine Reihe von Aminoglykosiden und der in vitro Resistenz der Ribosomen im Poly(U)-System vorliegt. Um einen Hinweis auf die Art des Resistenzmechanismus in anderen Produzenten von 4,6-disubstituierten Deoxystreptaminen der Gattung *Micromonospora* zu erhalten, wurden auch davon die Resistenzspektren bestimmt. In Tabelle 3 sind die minimalen Hemmkonzentrationen für *M. grisea*, *M. zionensis*, *M. inyoensis*, *M. sagamiensis* mit den Werten für *M. purpurea* und den nicht produzierenden, sensitiven Vergleichsstamm *M. melanosporea* zusammengefaßt. Es ist ersichtlich, daß ähnlich wie *M. purpurea* auch alle anderen Produzentenstämme eine sehr hohe Resistenz gegen sämtliche getesteten 4,6-disubstituierten Deoxystreptamine und auch gegen Hygromycin B, eine etwas erhöhte Resistenz gegen Lividomycin A und normale Sensitivität (wie der Vergleichsstamm *M. melanosporea*) gegenüber Neomycin, Paromomycin und Streptomycin zeigen. Die hohe Resistenz gegen Kasugamycin und Spectinomycin scheint mit der spezifischen "Produzentenresistenz" nicht in Verbindung zu stehen, da sie auch bei *M. melanosporea* vorliegt. Zu beachten ist ferner, daß *M. rhodorangea* als einziger Produzent eine stark erhöhte Resistenz gegen Streptomycin besitzt.

Str. tenebrarius, ein Organismus, der den Nebramycin-Komplex produziert, verfügt über eine extrem hohe Resistenz (>2mg/ml) gegen Aminoglykoside von so unterschiedlicher Struktur wie

Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentrationen von Aminoglykosiden
für *Micromonospora*-Stämme

Antibiotikum	MHK (µg/ml)						
	<i>M. melanospora</i>	<i>M. purpurea</i>	<i>M. grisea</i>	<i>M. zionensis</i>	<i>M. inyoensis</i>	<i>M. sagamiensis</i>	<i>M. rhodorangea</i>
4,6-Disubstituierte Deoxystreptamine							
Amikacin	0.6	>500	>500	>500	200	200	500
Gentamicin	2.5	>500	300	>500	>500	>500	>500
G-418	10	500	>500	>500	>500	>500	>500
Kanamycin	5	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Netilmicin	40	>500	100	>500	500	>500	>500
Sagamicin	1	500	20	500	500	320	>500
Sisomicin	5	>500	500	>500	>500	320	>500
Tobramycin	5	>500	200	>500	200	500	300
4,5-Disubstituierte Deoxystreptamine							
Lividomycin A	2.5	100	20	50	20	20	10
Neomycin	1.2	1.2	<1	<1	<1	<1	<1
Paromomycin	0.6	5	<1	5	<1	<1	5
Andere							
Kasugamycin	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Hygromycin B	5	500	400	>500	500	500	500
Spectinomycin	160	160	>500	100	50	400	>500
Streptomycin	5	10	0.5	1	0.5	0.5	100

Nebramycin-Komplex, Streptomycin, Kanamycin, Neomycin und Paromomycin (52). Yamamota et al. (21) zeigten, daß sich diese Hochresistenz auch auf Gentamicin C, Ribostamycin, Butirosin A, Lividomycin A, Neamin und Istamycin erstreckt.

Für den Istamycin-Produzenten *Str. tenjimariensis* waren bereits einige minimale Hemmkonzentrationen von Aminoglykosiden publiziert (50). Da aber ein Großteil der wichtigen Aminoglykoside nicht getestet worden war, wurden die minimalen Hemmkonzentrationen dafür bestimmt und in Tabelle 4 zusammengestellt. Als Vergleichsstamm diente *Str. lividans*, der kein Antibiotikum produziert. Unter Einbeziehung der Daten von Yamamoto et al. (50) lassen sich vier Gruppen - gegliedert nach Höhe der Resistenz - unterscheiden:

1. Extrem hohe Resistenz (>2 mg/ml) liegt gegen das eigene Produkt Istamycin A und B sowie gegen Kanamycin vor.
2. Hochresistent (MHK 0.3 bis 1 mg/ml) ist *Str. tenjimariensis* gegen Amikacin, Apramycin, Butirosin A, Ribostamycin, Sisomicin und Tobramycin.
3. Eine leicht erhöhte Resistenz (MHK 10 bis 25 μ g/ml) wurde für Gentamicin C, Antibiotikum G-418, Neomycin sowie Sagamicin gefunden.
4. Gegen Hygromycin B, Paromomycin und Streptomycin ist *Str. tenjimariensis* sensitiv. Hygromycin B wurde in diese vierte Gruppe eingereiht, da auch beim sensitiven Vergleichsstamm die minimale Hemmkonzentration bei 10 μ g/ml liegt.

Da auch eine ganze Reihe von *Nocardia*-Arten, die keine Aminoglykosid-Antibiotika produzieren, eine hohe natürliche Resistenz gegen Aminoglykoside besitzen (93), wurden die minimalen Hemmkonzentrationen auch für *N. asteroides* und *N. calcarea* ermittelt. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, ist *N. asteroides* gegen

alle getesteten Substanzen ziemlich hoch resistent, während *N. calcarea* nur mäßig resistent dagegen ist. Für diese beiden Stämme war zu prüfen, ob die Resistenz wie bei den untersuchten Produzenten ribosomaler Natur war.

Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentrationen von Aminoglykosiden für *Str. tenjimariensis*, *Str. lividans*, *N. asteroides* und *N. calcareo*

Antibiotium	MHK (µg/ml)			
	<i>Str.tenji.</i>	<i>Str.liv.</i>	<i>N.aster.</i>	<i>N.calc.</i>
<i>4,6-Disubstituierte Deoxystreptamine</i>				
Amikacin	300	0.5	50	5
Gentamicin	15	0.5	250	5
G-418	25	5	250	25
Kanamycin	2 000	1	250	25
Sagamicin	10	0.5	250	5
Sisomicin	500	0.5	100	10
Tobramycin	500	0.5	250	10
<i>4,5-Disubstituierte Deoxystreptamine</i>				
Neomycin	25	1	100	10
Paromomycin	2.5	0.5	25	5
<i>Andere</i>				
Apramycin	1 000	0.5	50	5
Hygromycin B	10	10	100	50

3.2. Vorkommen von Aminoglykoside modifizierenden Enzymen in den Produzenten

Während in *Str. tenebrarius* die Aktivität einer Aminoglykosid-Acetyltransferase (20) und eines Streptomycin phosphorylierenden Enzyms (21) nachgewiesen worden war, konnten in *Str. tenjimariensis* (51) und *M. purpurea* (11, 49) keine Aminoglykosid inaktivierenden Enzyme gefunden werden.

In den in dieser Arbeit untersuchten *Micromonospora*-Arten konnte weder Adenyltransferaseaktivität, die übrigens in *Actinomyceten* noch nie gefunden wurde, noch Phosphotransferaseaktivität entdeckt werden (Daten nicht gezeigt). Als Substrat diente jeweils Gentamicin und - soweit zugänglich - das eigene Antibiotikum, bei *M. rhodorangea* auch Streptomycin. Ähnlich wie bei *M. purpurea* und dem sensitiven *M. melanosporea* (49) ließ sich auch in diesen Stämmen eine unspezifische Acetyltransferase nachweisen, die aber für die Resistenz keine Bedeutung hat.

3.3. Optimierung des in vitro-Proteinsynthesesystems

Zur Analyse der Wirkungsweise der Aminoglykoside war die Entwicklung eines effektiven in vitro-Proteinsynthesesystems notwendig. Da diese Antibiotika mehrere verschiedene Schritte der Proteinbiosynthese beeinflussen, wäre ein Testsystem, das mit natürlicher mRNA arbeitet, wie etwa das für *E. coli* beschriebene R17-System (67, 69) am besten geeignet, da dieses auch den Einfluß auf die Initiation der Proteinsynthese miteinbezieht. Ein solches System steht aber für *Actinomyceten* bisher nicht zur Verfügung. Die Wirkungsweise der Antibiotika konnte daher nur in einem rein elongierenden System, der Poly(U)-abhängigen Polyphenylalaninsynthese, getestet werden. Der erste Schritt war daher, das Poly(U)-System für die einzelnen Arten zu optimieren. Es galt zum einen, die optimalen Präparationsbedingungen für S30 und S100 Rohextrakte sowie für Ribosomen zu

finden, andererseits die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im Testansatz so zu wählen, daß eine möglichst hohe ^{14}C -Phenylalanineinbaurate erzielt wurde.

3.3.1. Einfluß der Präparationsbedingungen von Rohextrakt und Ribosomen auf die Aktivität des Poly(U)-Systems

In einer der ersten Arbeiten, in denen die Resistenz des Streptomycin-Produzenten *Str. griseus* analysiert wurde, beschreiben Cella und Vining (29) einen "Faktor", der die Proteinsynthese *in vitro* blockiert. Es dürfte sich hierbei um Proteasen gehandelt haben, denn Valu und Szabó (94) konnten zeigen, daß sie im Poly(U)-System mit S30 Rohextrakt von *Str. griseus* eine ähnlich gute Aktivität erzielen konnten wie mit S30 von *E. coli*, wenn sie die Protease-Inhibitoren Phenylmethansulfonylfluorid (für Serin-Proteasen) und Mg-Titriplex (für Metallo-Proteasen) dem Test zusetzten. Die bei vielen Actinomyceten zu beobachtende proteolytische Aktivität scheint hauptsächlich erst zu Beginn der stationären Phase entwickelt zu werden (95). Die entsprechenden Proteasen sind an die Zelloberfläche gebunden oder sie werden ins Medium abgegeben; das Proteasegemisch Pro-nase von *Str. griseus* wird sogar direkt aus dem Kulturüberstand gewonnen (96).

Um zelloberflächengebundene Proteasen zu entfernen, wurden für alle Versuche die Zellen in der frühen bis mittleren Wachstumsphase geerntet - die ribosomale Resistenz wird in *Micromonospora* ja nicht erst kurz vor der Antibiotikumsproduktion entwickelt - und diese Zellen zweimal gründlich mit 1 M KCl enthaltenden Puffer gewaschen. Nach dieser Behandlung konnte der Zusatz von Protease-Inhibitoren während der Präparation von Ribosomen und Rohextrakt oder im Poly(U)-Test entfallen. Jedenfalls erbrachte 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid und 5 mM Mg-Titriplex keine erhöhte Aktivität der *in vitro*-Proteinsynthese.

Erste Untersuchungen der Polyphenylalanin-Synthese zeigten dann, daß die Wahl der Puffersubstanz für die Aktivität des *in*

vitro-Systems von ausschlaggebender Bedeutung war. Während in heterologen Poly(U)-Systemen (Ribosomen von Actinomyceten, S100 Rohextrakt von *E. coli*) mit Tris- oder HEPES-Puffer immer etwa die gleichen ^{14}C -Phenylalanineinbauraten erzielt wurden, zeigte Tris in homologen Systemen mit S30 Extrakt oder S100 plus Ribosomen aus Actinomyceten einen stark hemmenden Effekt. Abbildung 1 zeigt dies für *Str. lividans* und *Str. tenjimariensis*.

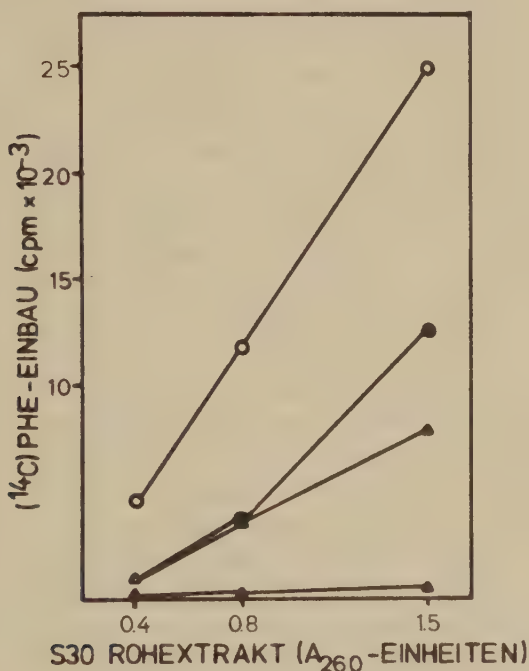


Abbildung 1:

Abhängigkeit der Aktivität des homologen Poly(U)-Systems von der Art der verwendeten Puffersubstanz.

Bei der Präparation des S30 Rohextraktes und im Poly(U)-Test wurden identische Puffer eingesetzt.

- : S30 Extrakt aus *Str. lividans*, HEPES
- : S30 Extrakt aus *Str. lividans*, Tris
- △: S30 Extrakt aus *Str. tenjimariensis*, HEPES
- ▲: S30 Extrakt aus *Str. tenjimariensis*, Tris

Für dieses Experiment wurde S30 Rohextrakt von beiden Stämmen in HMNSH präpariert und jeweils eine Hälfte davon zweimal gegen HMNSH, die andere zweimal gegen TMNSH dialysiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen dieser Extrakte in ein Poly(U)-System eingesetzt, das sich nur durch die Puffersubstanz (50 mM Tris/Cl pH 7.5 bzw. 50 mM HEPES/KOH pH 7.5) unterschied. S30 Extrakt von *Str. tenjimariensis* war in Anwesenheit von Tris völlig inaktiv, die Aktivität des S30 von *Str. lividans* wurde durch Tris um 50 % vermindert. Ähnliche Befunde wurden für *Micromonospora* erhalten, während bei *Str. tenebrarius*, *N. asteroides* und *N. calcarrea* die Puffersubstanz keinen Einfluß auf die Aktivität des Poly(U)-Systems ausübte.

Diese Hemmung durch Tris betrifft eindeutig eine Komponente des S100 Rohextrakts der Streptomyceten, da die Ribosomen zusammen mit S100 aus *E. coli* im Tris gepufferten Poly(U)-Test volle Aktivität zeigen; auch bei Verwendung von Tris-Puffer während der ganzen Präparationsprozedur von 70S Ribosomen oder Untereinheiten traten keinerlei Aktivitätsverluste auf. Bisher liegen allerdings keine Anhaltspunkte für die Ursache der hemmenden Wirkung von Tris vor.

In diesem Zusammenhang muß noch erwähnt werden, daß bei der Präparation ribosomaler Untereinheiten von *Str. tenjimariensis* nach der üblichen Methode im Saccharose-Dichtegradienten (siehe 2.5.2.) nur eine sehr unvollständige Trennung der beiden Partikel erfolgte. Es waren zwar keine undissoziierten 70S Ribosomen mehr vorhanden, das Trennprofil ähnelte aber Profilen, wo 70S Ribosomen in 10 mM Mg^{2+} ohne vorherige Dialyse gegen Dissoziationspuffer aufgetragen wurden, so daß die Untereinheiten erst nach Eintritt in den Gradienten dissoziierten. Eine normale Trennung in 30S- und 50S-Partikel konnte jedoch dadurch erreicht werden, daß die Dichtegradientenzentrifugation nicht wie üblich bei 4°C, sondern bei 15°C durchgeführt wurde.

3.3.2. Optimierung der Einzelkomponenten des Poly(U)-Systems

Ein von E. Cundliffe beschriebenes Poly(U)-System wurde zum

Testen der rekonstituierten 30S Untereinheit von *M. purpurea* verwendet und unverändert übernommen; das von uns ursprünglich für *Micromonospora* entwickelte (49), auf Rosset und Gorini (78) zurückgehende System mußte jedoch weiter optimiert werden, um den Materialverbrauch einzuschränken.

Die für die Aktivität der Ribosomen wichtigste ionische Komponente ist Magnesium, dessen optimale Konzentration bei einer konstanten Ammoniumchloridkonzentration zu 75 mM bestimmt wurde (Abbildung 2).

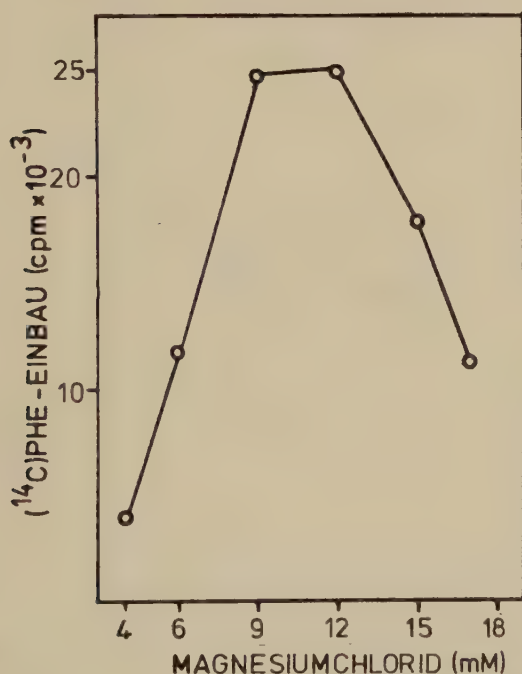


Abbildung 2:
Effekt der Mg^{2+} -Konzentration auf die Aktivität des in vitro Translationssystems mit homolog reassozierten Ribosomen von *M. purpurea*.

Ein sehr distinktes Optimum wurde auch für die eingesetzte Menge des S100 Rohextrakts gefunden (Abbildung 3). (Diese Optimierung wurde übrigens für jede S100-Präparation vorgenommen.) Bei der Verminderung der eingesetzten Ribosomen von 1 A₂₆₀ 50S auf 0.2 A₂₆₀ und von 0.7 A₂₆₀ 30S auf 0.15 A₂₆₀ im Testansatz zeigte sich, daß die tRNA-Menge halbiert und die Konzentration des S100 Rohextrakts neu optimiert werden mußte. Die Reduktion der Ribosomenkonzentration führte ebenfalls zu höherer Aktivität, ausgedrückt in polymerisierte Moleküle Phenylalanin pro Ribosom.

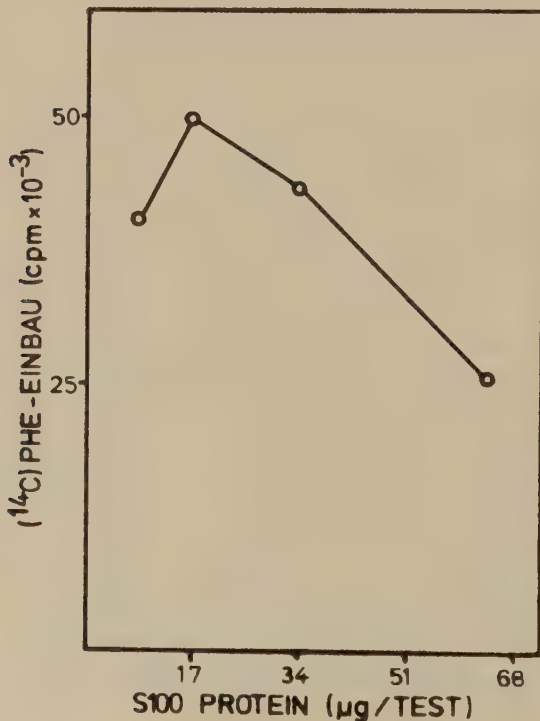


Abbildung 3:

Abhängigkeit der Aktivität des Poly(U)-Systems von der S100 Rohextrakt-Konzentration.

Der Zeitverlauf der ^{14}C -Phenylalanin-Inkorporation im 30S/50S Str. lividans-System ist in Abbildung 4 dargestellt.

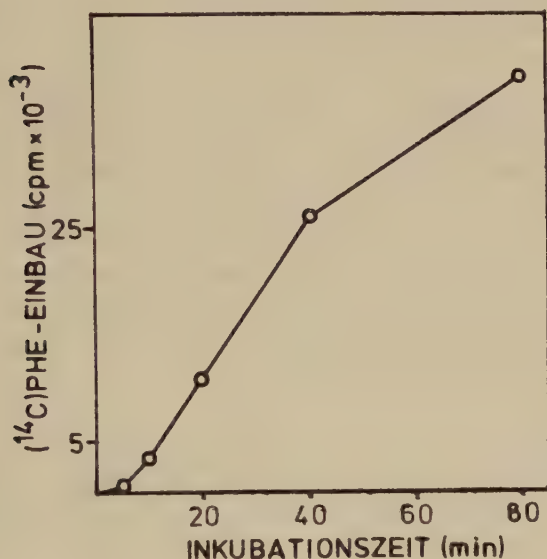


Abbildung 4:

Zeitabhängigkeit der Poly(U)-abhängigen Polyphenylalaninsynthese

Hieraus wurde die normalerweise eingehaltene Inkubationszeit von 45 min ermittelt, zu der die Einbaurrate noch linear verläuft. Die Aktivität der Ribosomen aus den einzelnen untersuchten Stämmen war im übrigen, wie auch bei von anderen Autoren (25, 21, 51) bearbeiteten Arten, sehr unterschiedlich; besonders die 50S Untereinheiten von *M. inyoensis*, *Str. tenjimariensis* und *Str. tenebrarius* waren relativ wenig aktiv. Es gelang nicht, diese geringe Aktivität dadurch zu steigern,

daß die Testansätze zuerst 7 min bei 37°C oder 45°C vorinkubiert wurden. Auch eine Präinkubation der 50S Untereinheit allein für 10 min bei 37°C in Rekonstitutionspuffer (siehe 2.7.4.) erbrachte keine erhöhte Aktivität. Ob S100 aus *E.coli* oder homologer S100 Rohextrakt eingesetzt wurde, hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der Streptomyces-Systeme. Um eventuelle Einflüsse unbekannter Enzyme in den Streptomyces-Rohextrakten auszuschließen, wurde für alle Untersuchungen *E. coli* S100 Rohextrakt verwendet. Im Falle von *Micromonospora* lieferte die Verwendung von homologem S100 jedoch eine zwei- bis dreifache Erhöhung der ^{14}C -Phenylalanineinbaurates im Poly(U)-System; es wurde deshalb stets Rohextrakt aus dem sensitiven Vergleichsstamm *M. melanosporea* eingesetzt. In Tabelle 5 sind die Aktivitäten der Ribosomen der untersuchten Stämme im Poly(U)-System zusammen mit Ergebnissen anderer Autoren vergleichend zusammengestellt.

3.4. Wirkung von Aminoglykosiden auf die Poly(U)-codierte Proteinsynthese und Bestimmung der für die Resistenz verantwortlichen Untereinheit

3.4.1. Aminoglykoside produzierende *Micromonospora*-Arten

In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, daß *M. purpurea*, ein Gentamicin produzierender Organismus, über einen ribosomalen Resistenzmechanismus verfügt und keine modifizierende Enzyme aufweist (49). Die völlige Übereinstimmung des in vivo-Resistenzspektrums von *M. purpurea* mit denen von *M. inyoensis* (Sisomicin), *M. grisea* (Verdamycin), *M. sagamiensis* (Sagamicin), *M. zionensis* (Antibiotikum G-52) und *M. rhodorangea* (Antibiotikum G-418) (Tab. 3) sowie das Fehlen Aminoglykosid inaktivierender Enzyme legte die Vermutung nahe, daß die genannten *Micromonospora*-Spezies über denselben ribosomalen Resistenzmechanismus verfügen wie *M. purpurea*. Abbildung 5 zeigt, daß die Ribosomen der Produzenten im Poly(U)-Test gegen ihr eigenes Antibiotikum tatsächlich hoch resistent sind; da

Tabelle 5: Aktivitätsvergleich der Poly(U)-Systeme verschiedener Actinomyceten

Herkunft der Ribosomen	Aktivität (Phe/Rib/Std)	Bemerkungen zum System
30S/50S <i>M. zionensis</i>	12.7	homologer S100 (HEPES)
30S/50S <i>M. melanospora</i>	12.7	
30S/50S <i>M. melanospora</i>	4.7	S100 <i>E. coli</i> (Tris)
30S/50S <i>Str. lividans</i>	16.2	a
30S/50S <i>Str. lividans</i>	36	b
30S/50S <i>Str. tenjimariensis</i>	1.2	a
30S <i>Str. tenji.</i> /50S <i>Str. liv.</i>	14.3	a
30S <i>Str. tenji.</i> /50S <i>Str. liv.</i>	40	b
30S <i>Str. liv.</i> /50S <i>Str. tenji.</i>	1.7	a
530 <i>Str. tenebrarius</i>	6	
30S/50S <i>Str. tenebrarius</i>	0.8	a
30S <i>Str. teneb.</i> /50S <i>Str. liv.</i>	4.6	a
30S <i>Str. teneb.</i> /50S <i>Str. liv.</i>	14	b
30S <i>Str. liv.</i> /50S <i>Str. teneb.</i>	2.2	a
30S <i>Str. liv.</i> /50S <i>Str. teneb.</i>	2.7	b
<u>Ergebnisse anderer Autoren:</u>		
70S <i>Str. tenjimariensis</i>	1.8	Yamamoto et al. (51)
70S <i>Str. griseus</i>	10.7	Yamamoto et al. (51)
70S <i>Str. coelicolor</i>	9	Skinner und Cundliffe (97)
70S <i>Str. capreolus</i>	1.3	Skinner und Cundliffe (97)
70S <i>Str. aureofaciens</i>	5	Mikulik et al. (98)
30S/50S <i>Str. aureofaciens</i>	3.8	Mikulik et al. (98)
70S <i>Str. tenebrarius</i>	10.1	Yamamoto et al. (21)

a: 0.7 A₂₆₀ 30S und 1 A₂₆₀ 50S/125 µl Test; S100 *E. coli* (Tris)

b: 0.15 A₂₆₀ 30S und 0.2 A₂₆₀ 50S/125 µl Test; S100 *E. coli* (Tris)

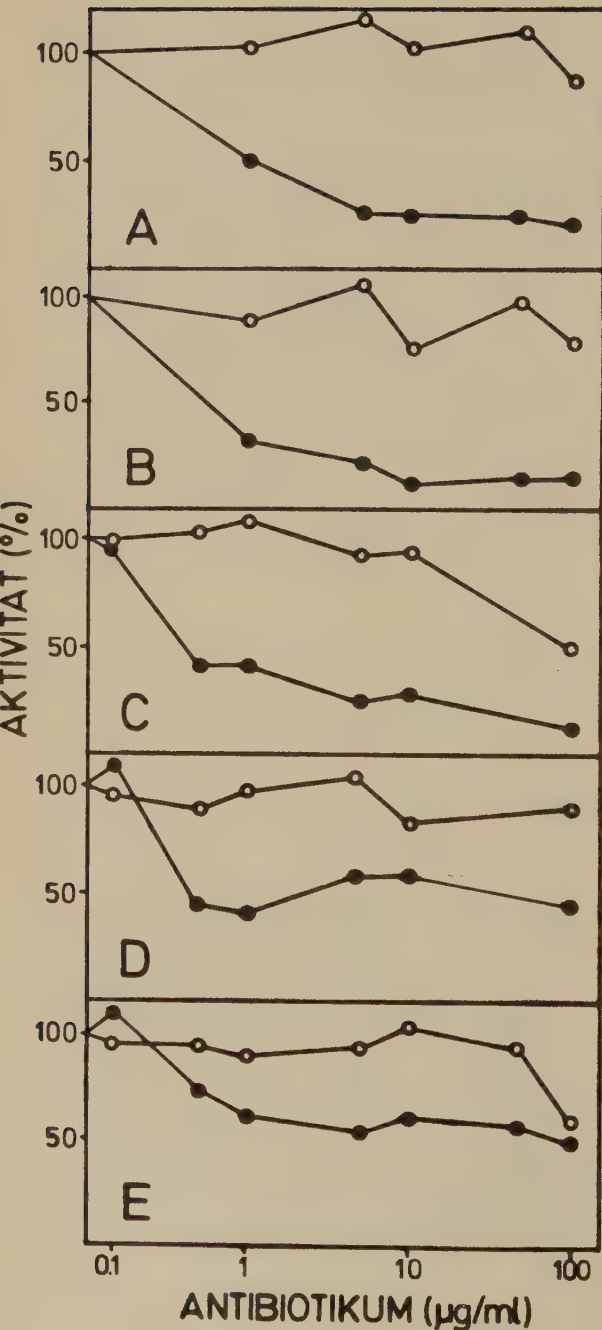


Abbildung 5:

Einfluß von Aminoglykosiden auf die Poly (U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an 70S Ribosomen von Aminoglykosid-produzierenden Micromonospora-Arten (o) und von *M. melanospora* (●).

Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 2 A260 70S Ribosomen.

A Ribosomen von *M. inyoensis* mit Sisomicin

B Ribosomen von *M. grisea* mit Kanamycin

C Ribosomen von *M. zio-nensis* mit Gentamicin

D Ribosomen von *M. saga-miensis* mit Sagamicin

E Ribosomen von *M. rhodo-rangea* mit Antibiotikum G-418

Verdamycin und Antibiotikum G-52 nicht zur Verfügung standen, wurden Kanamycin und Gentamicin getestet. Als Vergleich dienten jeweils Ribosomen des sensitiven *M. melanosporea*.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, welche Untereinheit des Ribosoms für diese Hochresistenz verantwortlich war. Zu diesem Zweck wurden ribosomale Untereinheiten der resistenten Produzentenstämme mit denen von *M. melanosporea* assoziiert. Die Benennung der reassozierten Ribosomen sei kurz am folgenden Beispiel erläutert:

30S/50S *M. purpurea* bedeutet, daß es sich um ein homolog reassoziertes Ribosom mit beiden Untereinheiten von *M. purpurea* handelt.

30S *M. purpurea*/50S *M. melanosporea* ist ein heterolog reassoziertes Ribosom mit der 30S Untereinheit von *M. purpurea* und der 50S Untereinheit von *M. melanosporea*.

Die Wirkung von Aminoglykosiden auf diese reassozierten Partikel im Poly(U)-System wurde analysiert; neben der Phenylalanineinbaurate wurde auch das durch das Antibiotikum induzierte Misreading - gemessen als Poly(U)-codierter Isoleucineinbau - bestimmt.

In Abbildung 6 ist das Ergebnis am Beispiel von *M. sagamiensis* dargestellt; die anderen Produzentenstämme zeigten das gleiche Ergebnis. Wie bei *M. purpurea* bestimmt auch bei den anderen *Micromonospora*-Arten die 30S Untereinheit allein die hohe Resistenz des Ribosoms. Reassozierte Partikel aus der 30S Untereinheit des resistenten Organismus und der 50S Untereinheit des sensitiven oder resistenten Ribosoms sind nämlich hoch resistent, das heißt, 4,6-disubstituierte Deoxystreptamine bewirken weder eine Hemmung der in vitro-Proteinsynthese noch induzieren sie erhöhtes Misreading. Umgekehrt verhalten sich Ribosomen mit der kleinen Untereinheit aus *M. melanosporea* und der großen aus sensitiven oder resistenten Ribosomen sensitiv, werden also durch diese Antibiotika gehemmt und zeigen erhöhtes Misreading.

Wie schon bei heterologen Partikeln aus 30S *M. purpurea*/50S *M.*

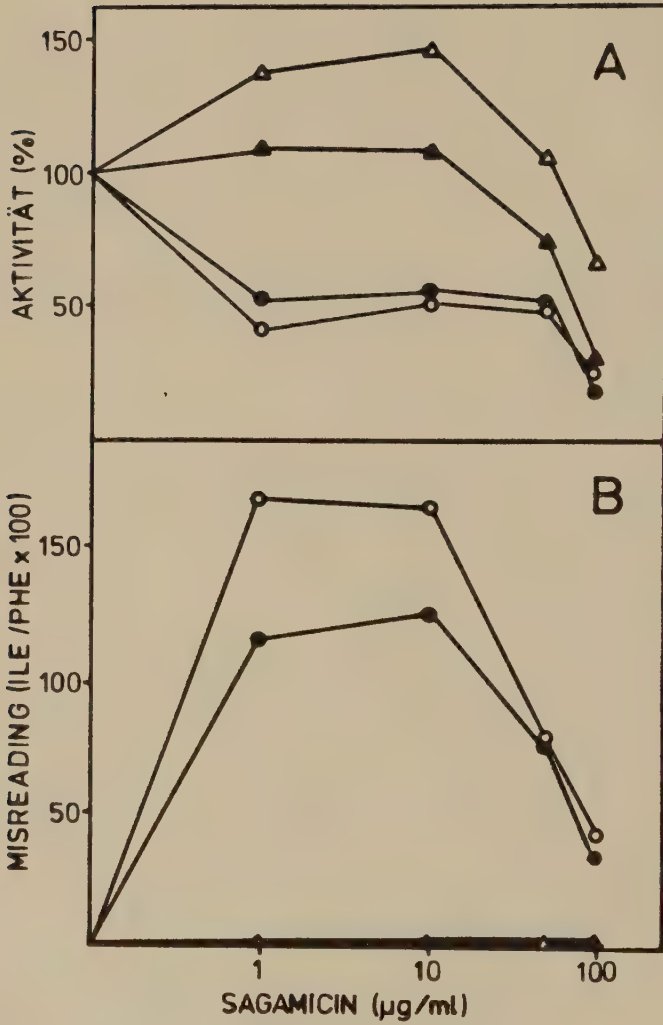


Abbildung 6:

Effekt von Sagamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an homolog und heterolog reassozierten Ribosomen von *M. sagamiensis* und *M. melanosporea*. Jeder Testansatz (125 µg) enthielt 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten. Dargestellt sind Hemmung (A) und durch Sagamicin induziertes Misreading (B).

- 30S/50S *M. melanosporea*
- 30S *M. melanosporea*/50S *M. sagamiensis*
- △ 30S *M. sagamiensis*/50S *M. melanosporea*
- ▲ 30S/50S *M. sagamiensis*

melanosporea hatte Gentamicin in höheren Konzentrationen auch für reassozierte Ribosomen aus 30S M. sagamiensis/50S M. melanosporea einen leicht stimulierenden Effekt, der allerdings bei den übrigen heterolog reassozierten Partikeln (30S resistent/50S sensitiv) nicht beobachtet werden konnte.

3.4.2. Streptomyces tenjimariensis (Istamycin-Produzent)

Nach Yamamoto et al. liegt bei Str. tenjimariensis nicht nur ribosomale Resistenz gegen das eigene Antibiotikum, Istamycin, sondern auch gegen eine Reihe weiterer Aminoglykoside (Kanamycin A, Neamin, Ribostamycin und Butirosin A) vor; dies steht in voller Übereinstimmung mit in vivo-Daten (50, 51). Die Autoren fanden auch keine Hinweise auf das Vorhandensein von Aminoglykoside inaktivierenden Enzymen.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war nun, zu untersuchen,

- a) ob die ribosomale Resistenz sich auch auf diejenigen Antibiotika erstreckt, gegen die der Organismus ebenfalls resistent ist (Tab. 4);
- b) ob eine Korrelation zwischen den vier Resistenzgruppen in vivo - gegliedert nach Höhe der minimalen Hemmkonzentrationen (siehe 3.1.) - und dem Grad der in vitro-Resistenz (im Poly(U)-System) besteht;
- c) welche Untereinheit des Ribosoms für die Resistenzen verantwortlich ist.

Schon bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration hatte sich gezeigt, daß Str. tenjimariensis gegen Gentamicin, Sagamicin und Antibiotikum G-418 nur eine ziemlich schwache Resistenz aufwies. Deshalb muß die ribosomale Resistenz von diesem Organismus anderer Art sein als diejenige der Micromonospora-Gruppe.

Nach den Daten anderer Autoren (51) als auch nach ersten eigenen Ergebnissen war die Aktivität des Poly(U)-Systems mit gereinigten 70S oder 30S/50S Ribosomen von *Str. tenjimariensis* relativ gering (Tab. 5); es war deswegen sinnvoll, die Bestimmung der für die Resistenz verantwortlichen Untereinheit vorzuziehen, um eventuell die für die Resistenz bedeutungslose Untereinheit durch die komplementäre aus dem sensitiven Vergleichsstamm ersetzen und so die Aktivität des *in vitro*-Proteinsynthesystems erhöhen zu können. Ein homologes System mit S30 Rohextrakt erbrachte zwar eine bessere Aktivität, wurde aber, um von vornherein jegliche möglichen Einflüsse von unbekannten (modifizierenden) Enzymen auszuschließen, nicht verwendet.

Auch für *Str. tenjimariensis* ließ sich durch Austauschexperimente die 30S Untereinheit als der die Resistenz gegen Kanamycin - Istamycin stand leider nicht zur Verfügung - bestimmende Teil des Ribosoms identifizieren. Reassozierte Ribosomen, bestehend aus der kleinen Untereinheit von *Str. tenjimariensis* und der großen von sensitiven *Str. lividans*, waren hoch resistent gegen Kanamycin, bis zu 200 µg/ml (Abb. 7, Abb. 9), während die Partikel aus der 30S Untereinheit von *Str. lividans* und aus 50S von *Str. tenjimariensis* normal sensitiv gegen Kanamycin waren (Abb. 8). Da die 50S Untereinheit keinerlei Einfluß auf die Resistenz zeigte, wurden auch die übrigen Antibiotika in einem Poly(U)-System mit heterologen Ribosomen (30S *Str. tenjimariensis*/50S *Str. lividans*) getestet. Dies hatte den zusätzlichen Vorteil, daß eine mehr als zehnfach höhere Aktivität erhalten werden konnte (Tab. 5). Gegen die Gruppe der Antibiotika, gegen die *Str. tenjimariensis* *in vivo* hoch resistent war (MHK 0.3 bis 1 mg/ml; siehe 3.1.), lag auch eine hohe ribosomale Resistenz vor. Apramycin, Sisomicin und Tobramycin ergaben eine Hemmung der Polyphenylalaninsynthese erst von Konzentrationen von etwa 50 µg/ml an; ein leicht erhöhtes Misreading (4.5 % bei 100 µg/ml) wurde nur durch Tobramycin induziert (Abbildung 9).

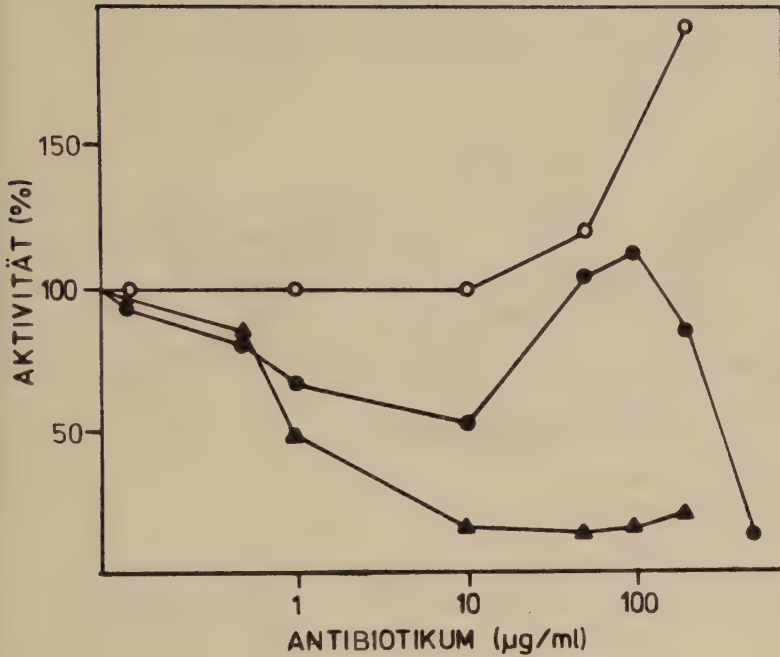


Abbildung 7:

Effekt verschiedener Aminoglykoside auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S Str. *tenjimariensis*/50S Str. *lividans*.

Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten.

○: Kanamycin ●: Sagamicin ▲: Antibiotikum G-418

Von besonderem Interesse war nun, ob die leicht erhöhte Resistenz gegen einige Aminoglykoside (MHK 10 bis 25 µg/ml; siehe 3.1.) ebenfalls ribosomaler Natur war; solche intermediären ribosomalen Resistenztypen wurden bisher ja nur in Laborstämmen von *E. coli* mit Mutationen in ribosomalen Proteinen (70, 100), nie aber in Produzenten beobachtet. Die Hemmwirkung von Gentamicin, Sagamicin, Antibiotikum G-418 und Neomycin auf die

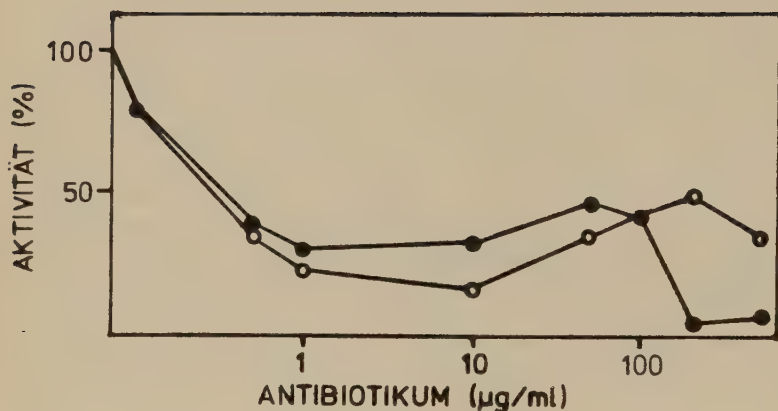


Abbildung 8:

Effekt von Gentamicin (o) und Kanamycin (•) auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S Str. lividans/50S Str. tenjimariensis. Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten.

Poly(U)-codierte Proteinsynthese durch Ribosomen aus 30S Str. tenjimariensis/50S Str. lividans (Abb. 7, Abb. 9) unterschied sich tatsächlich deutlich von der auf sensitive Ribosomen (Abb. 8, Abb. 11). Sowohl bei sensitiven homolog reassozierten Ribosomen aus Str. lividans (Abb. 11) als auch bei heterologen Ribosomen aus 30S Str. lividans/50S Str. tenjimariensis, die sich ja wie sensitive Ribosomen verhalten (Abb. 8), zeigte Gentamicin einen maximalen Hemmeffekt bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml. Im Gegensatz dazu verläuft die Hemmung der Polyphenylalaninsynthese mit 30S Str. tenjimariensis/50S Str. lividans durch die Aminoglykoside dieser Gruppe viel weniger drastisch, eine maximale Inhibition tritt erst bei Konzentrationen von etwa 10 µg/ml ein (Abb. 7, Abb. 9). Da die einzelnen Hemmkurven deutliche Unterschiede aufweisen, wurden

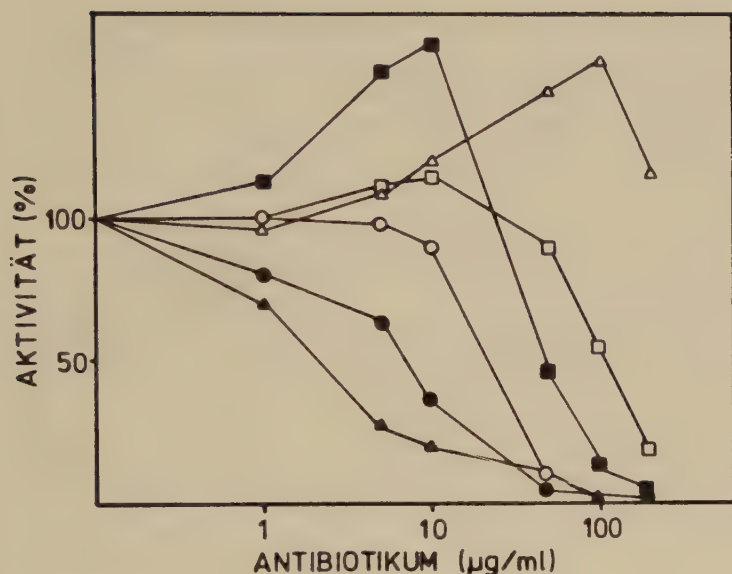


Abbildung 9:

Effekt verschiedener Aminoglykoside auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S Str. *tenjimariensis*/50S Str. *lividans*. Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 0.2 A₂₆₀ 50S und 0.15 A₂₆₀ 30S Untereinheiten.

○: Apramycin ▲: Neomycin
 ●: Gentamicin □: Sisomicin
 △: Kanamycin ■: Tobramycin

die drei Komponenten des Gentamicin C-Komplexes einzeln getestet (Abb. 10), wobei auch hier die Differenzen beträchtlich sind. Gentamicin C_{1a} hemmt relativ wenig, während Gentamicin C₂ und C₁ die für diese Aminoglykoside charakteristische maximale Hemmung bei 10 µg/ml zeigen; Komponente C₁ stimuliert aber, genau wie Sagamicin, stark die Aktivität dieses Systems von einer Konzentration von 10 µg/ml an.

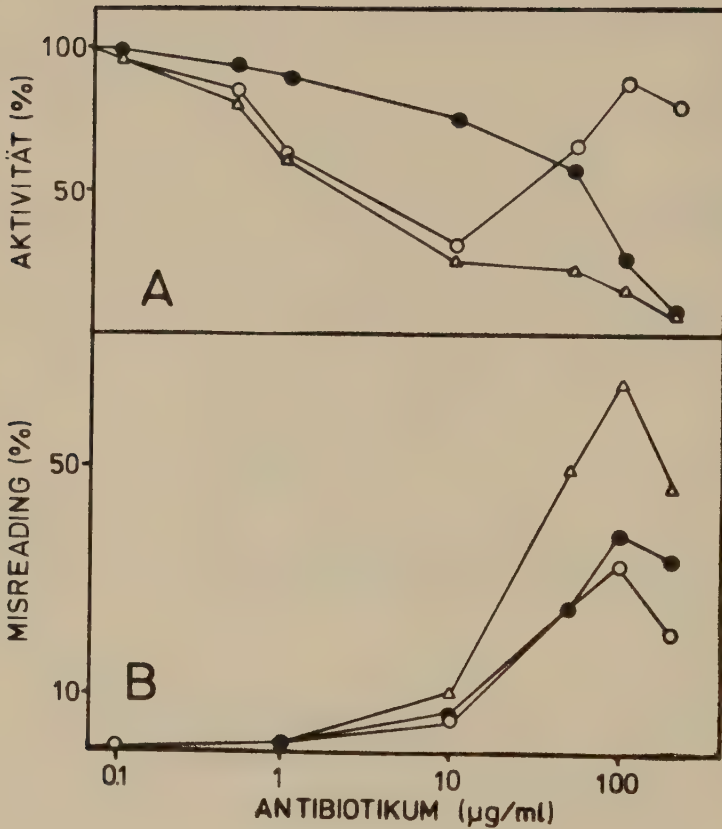


Abbildung 10:

Einfluß der einzelnen Komponenten des Gentamicin C-Komplexes auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S Str. *tenjimariensis*/50S Str. *lividans*. Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten. Dargestellt sind Hemmung (A) und induziertes Misreading (B).

○ Gentamicin C₁

● Gentamicin C_{1a}

△ Gentamicin C₂

Gentamicin beziehungsweise seine einzelnen Komponenten induzieren aber im Poly(U)-System mit Ribosomen, die die 30S Untereinheit von *Str. tenjimariensis* enthalten, ein ebenso starkes Misreading (Abb. 10) wie mit sensitiven Ribosomen von *Str. lividans* (Abb. 11).

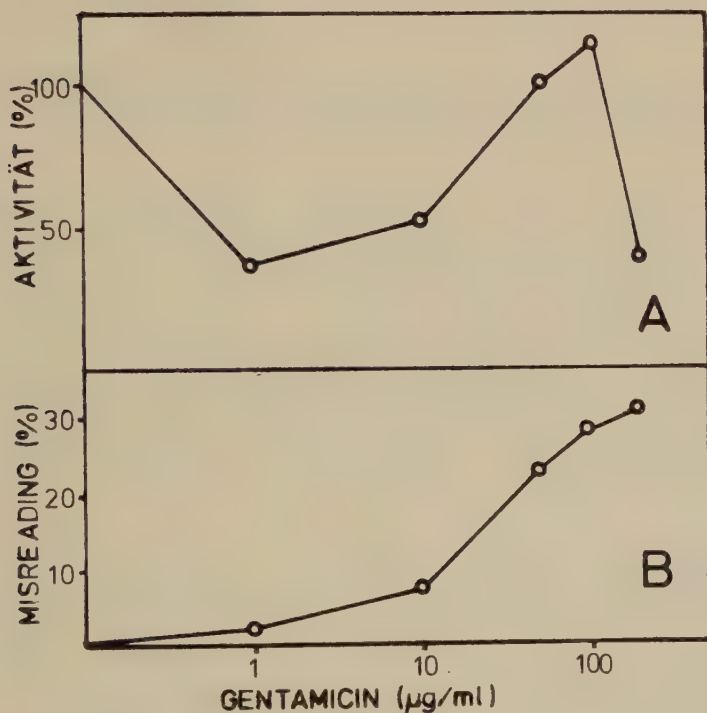


Abbildung 11:

Einfluß von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an homolog reassozierten Ribosomen von *Str. lividans*. Jeder Testansatz enthielt 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten. Dargestellt sind Hemmung (A) und durch Gentamicin induziertes Misreading (B).

Str. tenjimariensis besitzt also Ribosomen, deren kleine Untereinheit allein ein außergewöhnliches in vivo-Resistenzspektrum von Aminoglykosiden bestimmt:

1. Extrem hohe Resistenz (d.h. keine Hemmung und kein induziertes Misreading) gegen Kanamycin;
2. hohe Resistenz gegen Apramycin, Sisomicin und Tobramycin;
3. schwache Resistenz (d.h. weniger drastische Hemmung, aber normales Misreading) gegen Gentamicin C-Komplex, Sagamicin, Antibiotikum G-418 und Neomycin.

Zu bemerken ist noch, daß eine drastische Stimulation der Polyphenylalaninsynthese durch höhere Konzentrationen einiger Aminoglykoside, zum Beispiel Kanamycin, Tobramycin (Abb. 9), Sagamicin (Abb. 8) und Gentamicin C₁ (Abb. 10) verursacht wurde. Möglicherweise ist hierfür die sensitive 50S Untereinheit aus Str. lividans verantwortlich, da eine ähnliche Stimulation auch bei homologen Str. lividans-Ribosomen beobachtet wird (Abb. 11), jedoch kaum bei Ribosomen mit der großen Untereinheit aus Str. tenjimariensis (Abb. 8).

3.4.3. Streptomyces tenebrarius (Nebramycin-Produzent)

Als nächstes wurde der Mechanismus der Resistenz in Str. tenebrarius näher untersucht.

Str. tenebrarius, der Produzent des Nebramycin-Komplexes, besitzt aufgrund einer ribosomalen Resistenz und zusätzlicher modifizierender Enzyme Resistenz gegen alle getesteten Aminoglykoside (21). Yamamoto et al. hatten die Wirkung einer Reihe von Aminoglykosiden auf die Poly(U)-codierte Polyphenylalaninsynthese an Ribosomen von Str. tenebrarius untersucht und festgestellt, daß eine ribosomale Resistenz gegen Kanamycin A, B, C und Gentamicin C-Komplex vorliegt, die Ribosomen jedoch sensitiv gegen Neomycin und Paromomycin sind.

Dies deutete darauf hin, daß *Str. tenebrarius* denselben ribosomalen Resistenzmechanismus besitzt wie die hier untersuchten *Micromonospora*-Arten.

Es sollte nun in den folgenden Untersuchungen ermittelt werden,

1. ob die 30S Untereinheit auch in diesem Falle die Resistenz determiniert und
2. ob auch gegen Apramycin, einem Bestandteil des von *Str. tenebrarius* produzierten Nebramycin-Komplexes, ribosomale Resistenz vorliegt.

In Untereinheiten-Austauschexperimenten konnte gezeigt werden, daß auch in *Str. tenebrarius* die 30S Untereinheit allein den Resistenzcharakter des Ribosoms bestimmen kann. Heterolog reassozierte Ribosomen aus 30S *Str. tenebrarius*/50S *Str. lividans* waren im Poly(U)-System hoch resistent gegen Gentamicin (Abb. 12) und wurden durch höhere Gentamicin-Konzentrationen stimuliert, ohne ein stärkeres Misreading zu zeigen. Um zu prüfen, ob die Herkunft der sensitiven Untereinheit einen Einfluß auf diese Stimulation hat, wurde die 50S Untereinheit aus *Str. lividans* durch die große Untereinheit von *M. purpurea* ersetzt. In diesem Falle war ebenso wie mit 70S Ribosomen von *Str. tenebrarius* keine Stimulation der Polyphenylalaninsynthese durch höhere Gentamicin-Konzentrationen zu beobachten. Dieses Ergebnis stimmt mit unseren früheren Untersuchungen an *M. purpurea* und *M. melanosporea* überein (49), in denen gezeigt wurde, daß diese Stimulation durch einen spezifischen Effekt des Gentamicins auf die 50S Untereinheit bewirkt wird. Der Stimulationseffekt tritt nämlich nur bei (nativen, homolog oder heterolog reassozierten) Ribosomen mit der 50S Untereinheit aus sensitiven Organismen auf.

Diese Beobachtung sowie die Tatsache, daß zum Beispiel Spermidin nur eine äußerst geringe Aktivitätssteigerung bewirkt, zeigen, daß es sich bei der Stimulation nicht um einen einfachen

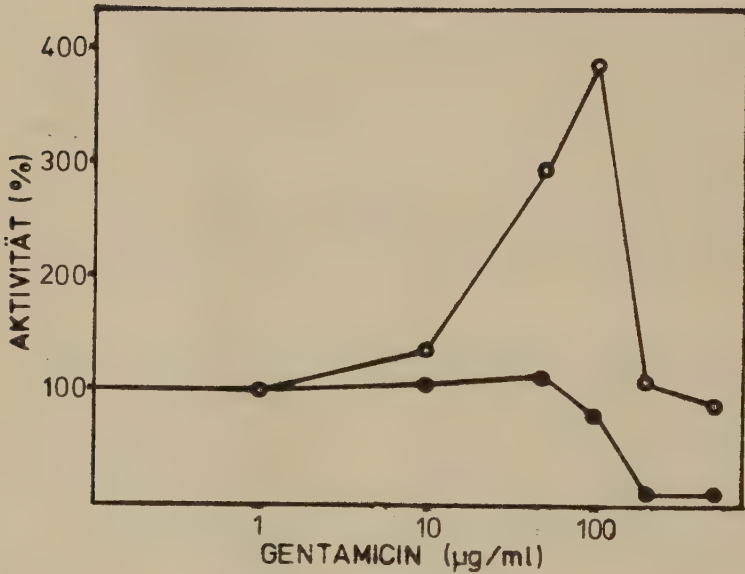


Abbildung 12:

Effekt von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese durch heterolog reassozierte Ribosomen aus 30S Str. tenebrarius/50S Str. lividans (o) und 30S Str. tenebrarius/50S M. purpurea (●).

Jeder Testansatz enthielt 1 A₂₆₀ 50S und 0.7 A₂₆₀ 30S Untereinheiten.

Die Hemmkurve für 70S Ribosomen von Str. tenebrarius ist identisch mit der für Ribosomen aus 30S Str. tenebrarius/50S M. purpurea.

kationischen Effekt handelt.

Die Höhe der Stimulation ist abhängig von der Aktivität des in vitro-Translationssystems; Poly(U)-Systeme mit wenig aktiven Ribosomen (Tab. 5, Abb. 12) werden stärker stimuliert als solche mit aktiveren Ribosomen (Tab. 5, Abb. 9).

Der Effekt von Gentamicin auf die in vitro-Polypeptidsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S Str. *lividans*/50S Str. *tenebrarius* ist in Abbildung 13 dargestellt. Überraschenderweise sind diese Ribosomen mit der 50S Untereinheit von Str. *tenebrarius* leicht resistent gegen Gentamicin, verglichen mit 30S/50S Ribosomen von Str. *lividans* (Abb. 11). Allerdings trägt diese Eigenschaft der 50S Untereinheit nicht zu einer höheren Gesamtresistenz der Ribosomen von Str. *tenebrarius* bei, da 70S Ribosomen dieses Organismus nicht höher resistent gegen Gentamicin sind als heterolog reassozierte Ribosomen mit der die Resistenz determinierenden 30S Untereinheit von Str. *tenebrarius* und der großen Untereinheit aus dem sensitiven Str. *lividans*. Das durch Gentamicin induzierte Misreading ist im Poly(U)-System mit heterolog reassozierten Ribosomen, die die 50S Untereinheit von Str. *tenebrarius* haben (Abb. 13), ebenso hoch wie mit sensitiven Ribosomen (Abb. 11).

Aus der von Yamamoto et al. veröffentlichten Arbeit geht hervor, daß die Ribosomen von Str. *tenebrarius* schwach resistent gegen Lividomycin A, aber sensitiv gegen Neomycin und Paromomycin sind. Allerdings erscheinen diese Daten besonders in bezug auf Neomycin widersprüchlich, da die Polyphenylalaninsynthese bei Verwendung von S100 Rohextrakt aus einem sensitiven Vergleichs-Organismus durch dieses Antibiotikum angeblich gehemmt wurde, bei Zugabe von S100 Extrakt von Str. *tenebrarius* jedoch nicht. Das bei diesen Tests verwendete Poly(U)-System enthielt kein zusätzliches Acetyl-CoA, Cosubstrat der Acetyltransferase von Str. *tenebrarius*, so daß die Herkunft des S100 Rohextrakts keinen Einfluß auf Wirkung von Neomycin auf die in vitro-Proteinsynthese mit Str. *tenjimariensis*-Ribosomen haben dürfte.

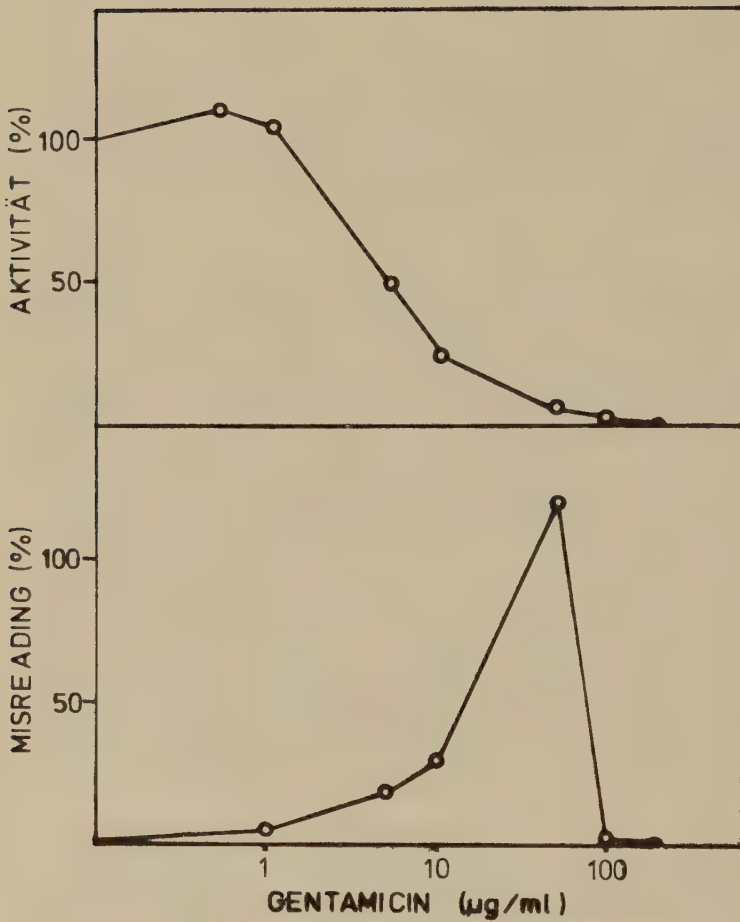


Abbildung 13:

Effekt von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S Str. *lividans*/50S Str. *tenebrarius*. Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 0.2 A₂₆₀ 50S und 0.15 A₂₆₀ 30S Untereinheiten. Dargestellt sind Hemmung (A) und durch Gentamicin induziertes Misreading (B).

Deshalb wurde der Einfluß der oben genannten Aminoglykoside sowie der von Apramycin, einem Bestandteil des von *Str. tenebrarius* produzierten Nebramycin-Komplexes auf die *in vitro*-Translation untersucht.

Abbildung 14 zeigt den Effekt von Apramycin und Neomycin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S *Str. tenebrarius*/50S *Str. lividans* und - im Vergleich dazu - an Ribosomen von *Str. lividans*. Die 30S Untereinheit von *Str. tenebrarius* determiniert auch in diesem Falle eine hohe Resistenz gegen beide Antibiotika. Apramycin und Neomycin wurden ebenfalls im Poly(U)-System

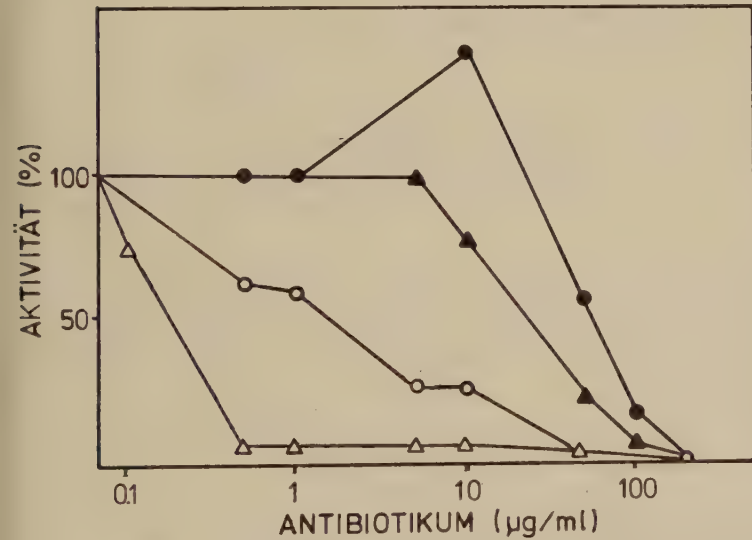


Abbildung 14:
Effekt von Apramycin und Neomycin auf die Poly(U)-codierte Polyphenylalaninsynthese an homolog reassozierten Ribosomen von *Str. lividans* (O, Δ) und heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S *Str. tenebrarius*/50S *Str. lividans* (●, ▲). Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 0.2 A₂₆₀ 50S und 0.15 A₂₆₀ 30S Untereinheiten.

Apramycin: O, ●

Neomycin: Δ, ▲

mit 70S Ribosomen von *Str. tenebrarius* getestet, wodurch obige Ergebnisse bestätigt wurden: die Ribosomen von *Str. tenebrarius* sind gegen das eigene Antibiotikum Apramycin sowie gegen Neomycin hoch resistent, während sie gegen Paromomycin und Lividomycin A (Abb. 15) sensitiv sind.

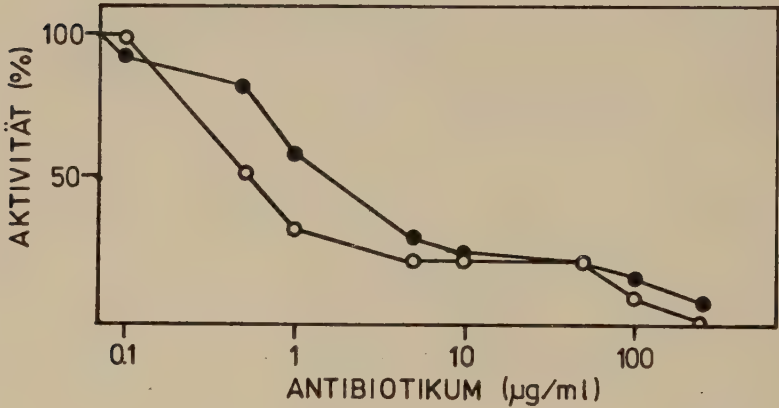


Abbildung 15:

Effekt von Paromomycin (o) und Lividomycin A (•) auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese an heterolog reassozierten Ribosomen aus 30S *Str. tenebrarius*/50S *Str. lividans*. Jeder Testansatz (125 µl) enthielt 0.2 A₂₆₀ 50S und 0.15 A₂₆₀ 30S Untereinheiten.

3.4.4. Nocardia asteroides und Nocardia calcarea

Sehr viele *Nocardia*-Stämme besitzen ein breites Spektrum an Resistenzen gegen Aminoglykoside (93).

Es erschien interessant zu prüfen, ob diese Bakteriengruppe über ribosomale Selbstschutz-Mechanismen verfügt, ob also dieser Resistenztyp auch bei Bakterien vorkommt, die keine Aminoglykoside produzieren. Als Beispiele wurden zwei *Nocardia*-Arten,

N. asteroides und *N. calcarrea*, der nach Abschluß dieser Arbeit allerdings als *Rhodococcus* identifiziert wurde (Dr. Kroppenstedt, persönliche Mitteilung), ausgewählt, die hoch beziehungsweise leicht resistent gegen eine Reihe von Aminoglykosiden sind (Tab. 4). Der Einfluß von Gentamicin auf die Proteinsynthese wurde im Poly(U)-System mit S30 Rohextrakt beider Arten getestet (Abb. 16). Die Ribosomen von *N. calcarrea* sind sensitiv, die von *N. asteroides* anscheinend etwas resistenter. Die hohe minimale Hemmkonzentration dieses Organismus für Gentamicin (250 µg/ml) kann jedoch damit nicht erklärt werden. Wahrscheinlicher ist, daß auch *N. asteroides* vollständig sensitive Ribosomen hat, und daß die scheinbare Resistenz auf das Vorhandensein von Phosphotransferasen, die in einigen Nocardien nachgewiesen wurden (101), zurückzuführen ist; diese können

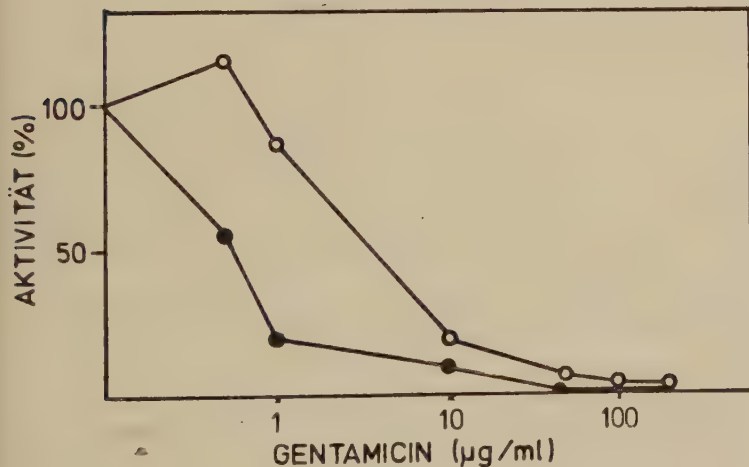


Abbildung 16:
Effekt von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalansynthese an Ribosomen von *Nocardia asteroides* (o) und *N. calcarrea* (●). Jeder Testansatz enthielt 1.5 A₂₆₀ S30 Rohextrakt.

einen Teil des im Poly(U)-System eingesetzten Antibiotikums inaktivieren - Cosubstrat ATP ist ja Bestandteil des Poly(U)-Systems -. Ein ähnlicher Befund wurde für die Wirkungsweise der Streptomycin-6-Phosphotransferase von *Str. griseus* im in vitro-Proteinsynthesystem gezeigt (31).

3.5. Totalrekonstitutionen der 30S Untereinheit zur Bestimmung der die Resistenz determinierenden ribosomalen Komponente

Die vorangegangenen Untersuchungen hatten ergeben, daß in den untersuchten Produzentenstämmen jeweils eine veränderte 30S Untereinheit allein die Resistenz gegen Aminoglykoside determiniert. Um zu sehen, ob diese Resistenz nun durch eine Veränderung der 16S rRNA oder von ribosomalen Protein(en) verursacht wurde, wurden heterologe Totalrekonstitutionen der 30S Untereinheit durchgeführt. Dabei wurden 16S rRNA aus resistenten Ribosomen der Aminoglykosid-Produzenten mit TP30 (Gesamtprotein der ribosomalen 30S Untereinheit) von sensitiven Organismen - und umgekehrt - nach der Vorschrift von Traub und Nomura (80) zu aktiven 30S Partikeln rekonstituiert. Nach Supplementierung mit nativen 50S Untereinheiten wurde das Verhalten dieser rekonstituierten Partikel gegenüber Aminoglykosiden im Poly(U)-System untersucht. Rekonstituierte 30S Untereinheiten mit der die Resistenz determinierenden Komponente aus den Produzenten sollten gegen entsprechende Aminoglykoside ebenso resistent sein wie die nativen Partikel der resistenten Arten.

3.5.1. Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen

Vergleich der nativen und rekonstituierten 30S Partikel

Um die Wirkung von Aminoglykosiden auf die Polyphenylalaninsynthese mit rekonstituierten und nativen 30S Untereinheiten vergleichen zu können, war es notwendig, eine möglichst hohe Effizienz der Rekonstitution zu erzielen; im besten Fall sollten rekonstituierte 30S Partikel im Poly(U)-System genauso aktiv

sein wie native. Erste Versuche, die genau nach der von Traub und Nomura beschriebenen Methode (80) durchgeführt wurden, ergaben nur etwa 15 % Aktivität im Vergleich zu nativen Ribosomen. Diese Rekonstitutionen waren mit ribosomalem Protein durchgeführt worden, das in Visking-Dialysierschläuchen dialysiert worden war; die Verwendung von Spectropor-Dialysierschläuchen Nr. 3 (Porenweite 6 000 Molekulargewicht) ergab bereits eine Effizienz von 71 %. Die Erhöhung der eingesetzten Menge von TP30 führte schließlich zu einer Rekonstitutionseffizienz von 100 % (Tab. 6).

Tabelle 6: Einfluß der eingesetzten Menge ribosomalen Proteins auf die Rekonstitutionseffizienz bei *M. purpurea*

<u>16S rRNA : TP30-Äquivalente^a</u>	<u>Rekonstitutionseffizienz^b</u>
1 : 1.2	71 %
1 : 1.5	99.8 %
1 : 2	100 %

a: Ein Äquivalent TP30 ist die der 16S rRNA entsprechenden Menge an ribosomalem Gesamtprotein der 30S Untereinheit.

b: Als Vergleich (100 %) diente die Aktivität von nativen 30S Untereinheiten von *M. purpurea* im Poly(U)-System.

In einigen Fällen war aber auch durch Erhöhung der Proteinmenge nicht die erwartete Steigerung zu erreichen. Selbst eine Zugabe von mehr als zwei A₂₆₀-Äquivalenten TP30 pro 16S rRNA erbrachte nie eine weitere Steigerung. Dies wiederum konnte dadurch ausgeglichen werden, daß die im Poly(U)-System eingesetzte Menge

rekonstituierter 30S Partikel erhöht wurde. Deshalb wurde für jede rekonstituierte Untereinheit die optimale Konzentration bei gleichem 50S-Gehalt ermittelt; teilweise mußte, um eine optimale Aktivität im Poly(U)-System zu erzielen, die eingesetzte Menge rekonstituierter 30S Partikel verdoppelt werden. Die Aktivitäten aller rekonstituierter 30S Untereinheiten sind in Tabelle 7 dargestellt. Wie ein Vergleich mit Tabelle 5 zeigt, lagen ihre Aktivitäten etwa im Bereich derjenigen von nativen Partikel, teilweise sogar etwas darüber (Str. tenebrarius).

Es sei noch vermerkt, daß zum Testen der Aminoglykoside immer frisch präparierte rekonstituierte 30S Partikel verwendet wurden, da durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff ein Großteil der Aktivität verloren ging.

Während sich rekonstituierte 30S Untereinheiten trotz Fehlen von ribosomalem Protein S1 in allen untersuchten Funktionen nicht von nativen Partikeln unterscheiden (102), induzieren Aminoglykoside bei rekonstituierten Partikeln (Abbildungen 18, 19, 20) ein wesentlich geringeres Misreading, nur etwa 20 % desjenigen an nativen Partikeln (Abb. 10). Um zu untersuchen, ob die übliche Präparationsmethode der 16S rRNA (Phenolextraktion) dabei eine Rolle spielt, wurde auch eine Rekonstitution mit LiCl/Harnstoff extrahierter RNA durchgeführt; die erhaltenen Partikel zeigen jedoch genau dasselbe verminderte Misreading.

3.5.2. Effekt von Aminoglykosiden im Poly(U)-System auf homolog und heterolog rekonstituierte 30S Untereinheiten - Bestimmung der für die Resistenz verantwortlichen ribosomalen Komponente

Um zu zeigen, ob die 16S rRNA oder ob ribosomale Proteine die Resistenz der 30S Untereinheit und somit des ganzen Ribosoms determinieren, wurden heterolog rekonstituierte Partikel aus der 16S rRNA von Produzenten und aus TP30 vom sensitiven Vergleichsstamm (und umgekehrt) und als Kontrolle die homologen Paarungen von Produzent und Vergleichsstamm hergestellt und im

Tabelle 7: Vergleich der Aktivitäten von Poly(U)-Systemen mit rekonstituierten 30S Untereinheiten

1. Rekonstituierte 30S Untereinheit von *M. purpurea*

50S: <i>M. purpurea</i> (3 pMol/50 µl-Test)	Aktivität (Phe/Rib/Std)
native 30S <i>M. purpurea</i>	23.6
16S rRNA <i>purpurea</i> /TP30 <i>purpurea</i>	27.7
16S rRNA <i>purpurea</i> /TP30 <i>melanosporea</i>	26.7
16S rRNA <i>melanosporea</i> /TP30 <i>purpurea</i>	20.3
16S rRNA <i>melanosporea</i> /TP30 <i>melanosporea</i>	21.2

2. Rekonstituierte 30S Untereinheit von *Str. tenebrarius*

50S: <i>Str. lividans</i> (1 A ₂₆₀ /125 µl-Test)	
native 30S <i>Str. lividans</i>	14.8
16S rRNA <i>tenebrarius</i> /TP30 <i>tenebrarius</i>	7.1
16S rRNA <i>tenebrarius</i> /TP30 <i>lividans</i>	10.6
16S rRNA <i>lividans</i> /TP30 <i>tenebrarius</i>	10.5
16S rRNA <i>lividans</i> /TP30 <i>lividans</i>	12.6

3. Rekonstituierte 30S Untereinheit von *Str. tenjimariensis*

50S: <i>Str. lividans</i> (0.2 A ₂₆₀ /125 µl-Test)	
native 30S <i>Str. lividans</i>	22.6
16S rRNA <i>tenjimariensis</i> /TP30 <i>tenjimariensis</i>	27.5
16S rRNA <i>tenjimariensis</i> /TP30 <i>lividans</i>	28.8
16S rRNA <i>lividans</i> /TP30 <i>tenjimariensis</i>	21.9
16S rRNA <i>lividans</i> /TP30 <i>lividans</i>	22.2

Poly(U)-System auf ihr Verhalten gegenüber Aminoglykosiden getestet.

Im Falle von *M. purpurea* (Abb. 17) bestimmt allein die Herkunft der 16S rRNA den Resistenzcharakter des Ribosoms; ribosomale Proteine scheinen keinen Einfluß darauf zu haben. Die heterologen Partikel aus 16S rRNA *M. purpurea*/TP30 *M. melanospora* sind nämlich gegen Gentamicin genauso resistent wie homologe aus 16S rRNA/TP30 *M. purpurea*; umgekehrt sind heterolog rekonstituierte 30S Untereinheiten (16S rRNA *M. melanospora*/TP30 *M. purpurea*) ebenso wie die homologe aus 16S rRNA/TP30 *M. melanospora* sensitiv gegen Gentamicin.

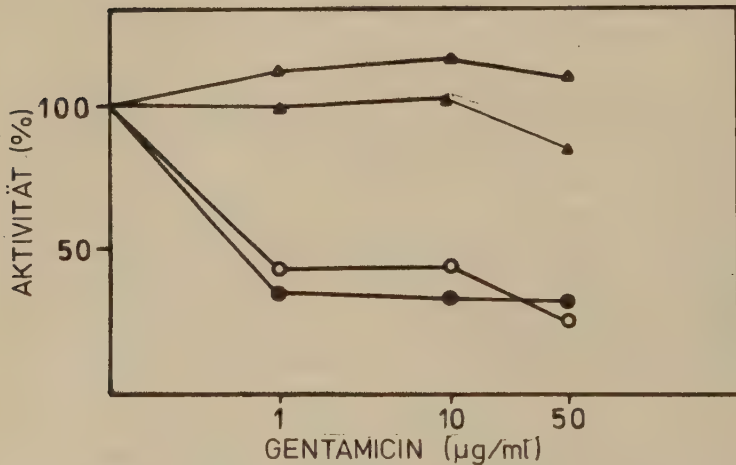


Abbildung 17:

Effekt von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalansynthese durch homolog und heterolog rekonstituierte 30S Untereinheiten von *M. purpurea* and *M. melanospora*. Die 50S Untereinheit war von *M. purpurea*.

- : 30S aus 16S rRNA *M. melanospora*/TP30 *M. melanospora*
- : 30S aus 16S rRNA *M. melanospora*/TP30 *M. purpurea*
- △: 30S aus 16S rRNA *M. purpurea*/TP30 *M. melanospora*
- ▲: 30S aus 16S rRNA *M. purpurea*/TP30 *M. purpurea*

Auch im Fall von *Str. tenebrarius* hatte die Herkunft der Proteinkomponente des Ribosoms keinen Einfluß auf die Resistenz der 30S Untereinheit (Abb. 18). Rekonstituierte 30S Partikel aus 16S rRNA des resistenten *Str. tenebrarius* und aus TP30 von *Str. tenebrarius* oder dem sensitiven Vergleichsstamm *Str. lividans* waren hoch resistent gegen Gentamicin; vollständig sensitiv waren Ribosomen, die 16S rRNA aus *Str. lividans* enthielten. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Misreading-Daten: Gentamicin induziert in höheren Konzentrationen Misreading durch rekonstituierte 30S Ribosomen mit der 16S rRNA aus *Str. lividans*, jedoch nicht bei solchen mit der 16S rRNA aus *Str. tenebrarius*; dies ist unabhängig davon, aus welchem Organismus die ribosomalen Proteine isoliert wurden.

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Produzentenstämmen, deren Ribosomen entweder aufgrund einer Eigenschaft der 16S rRNA hoch resistent oder normal sensitiv gegen die verschiedenen Aminoglykoside reagierten, lag bei *Str. tenjimariensis* neben der Hochresistenz gegen Kanamycin auch eine schwache Resistenz gegen einige Antibiotika, zum Beispiel Gentamicin (Abb. 10) vor, die den durch Mutationen in ribosomalen Proteinen bedingten Resistenzen in Laborisolaten (70) glich. Interessanterweise wurde nun in *Str. tenjimariensis* auch die schwache Gentamicin-Resistenz (Abb. 19) genau wie die Kanamycin-Resistenz (Abb. 20) von 16S rRNA alleine determiniert. Rekonstituierte Untereinheiten mit der 16S rRNA von *Str. tenjimariensis* verhielten sich wie die nativen 30S Partikel von dieser Art (Abb. 9) - die Herkunft des ribosomalen Proteins war wiederum bedeutungslos - gegenüber Kanamycin. Weder wurde die Polyphenylalaninsynthese gehemmt noch Misreading induziert; Untereinheiten aus 16S rRNA von *Str. lividans* waren gegen Kanamycin sensitiv (Abb. 20). Gegen Gentamicin erschienen die rekonstituierten 30S Untereinheiten mit der 16S rRNA aus *Str. tenjimariensis* wesentlich resistenter (deutliche Hemmung erst bei einer Konzentration von 100 µg/ml) als native Partikel von *Str. tenjimariensis*, die durch das Antibiotikum schon in einer Konzentration von 10 µg/ml

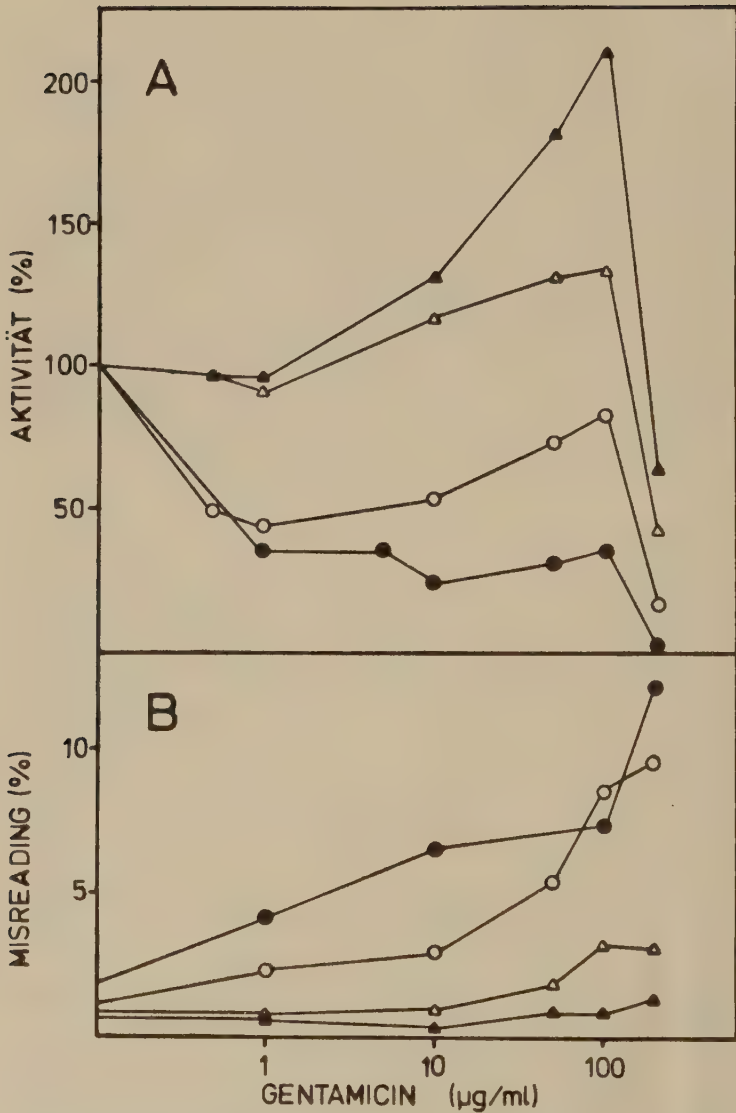


Abbildung 18:

Effekt von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalansynthese durch homolog und heterolog rekonstituierte 30S Untereinheiten von *Str. tenebrarius* und *Str. lividans*. Die 50S Untereinheit war von *Str. lividans*. Dargestellt sind die Hemmung (A) und das durch Gentamicin induzierte Misreading (B).

- : 30S aus 16S rRNA *Str. lividans*/TP30 *Str. lividans*
- : 30S aus 16S rRNA *Str. lividans*/TP30 *Str. tenebrarius*
- △: 30S aus 16S rRNA *Str. tenebrarius*/TP30 *Str. lividans*
- ▲: 30S aus 16S rRNA *Str. tenebrarius*/TP30 *Str. tenebrarius*

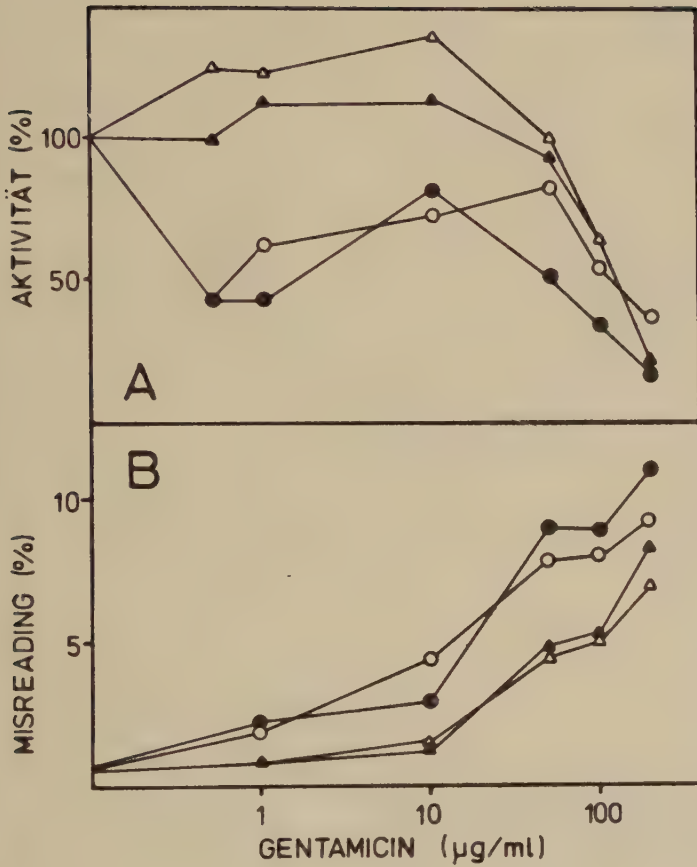


Abbildung 19:

Effekt von Gentamicin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalansynthese durch homolog und heterolog rekonstituierte 30S Untereinheiten von *Str. tenjimariensis* und *Str. lividans*. Die 50S Untereinheit war von *Str. lividans*. Dargestellt sind die Hemmung (A) und das durch Gentamicin induzierte Misreading (B).

- : 30S aus 16S rRNA *Str. lividans*/TP30 *Str. lividans*
- : 30S aus 16S rRNA *Str. lividans*/TP30 *Str. tenjimariensis*
- △: 30S aus 16S rRNA *Str. tenjimariensis*/TP30 *Str. lividans*
- ▲: 30S aus 16S rRNA *Str. tenjimariensis*/TP30 *Str. tenjimariensis*

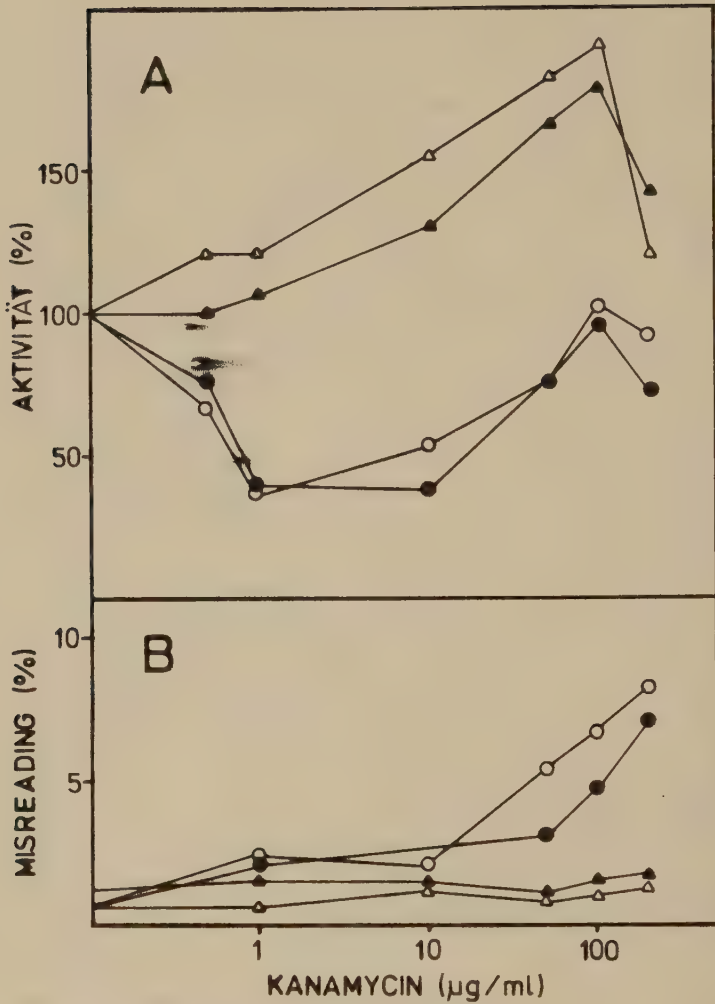


Abbildung 20:

Effekt von Kanamycin auf die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese durch homolog und heterolog rekonstituierte 30S Untereinheiten von *Str. tenjimariensis* und *Str. lividans*. Die 50S Untereinheit war von *Str. lividans*. Dargestellt sind die Hemmung (A) und das durch Kanamycin induzierte Misreading (B).

- : 30S aus 16S rRNA *Str. lividans*/TP30 *Str. lividans*
- : 30S aus 16S rRNA *Str. lividans*/TP30 *Str. tenjimariensis*
- △: 30S aus 16S rRNA *Str. tenjimariensis*/TP30 *Str. lividans*
- ▲: 30S aus 16S rRNA *Str. tenjimariensis*/TP30 *Str. tenjimariensis*

maximal inhibiert wurden (Abb. 19; Abb. 10). Allerdings war das durch Gentamicin bei diesen vermeintlich resistenten Partikeln induzierte Misreading ähnlich hoch wie im Fall der sensitiven rekonstituierten Untereinheiten mit 16S rRNA aus *Str. lividans* (Abb. 19). Zu bemerken ist, daß auch für diese schwache Gentamicin-Resistenz die Herkunft des ribosomalen Proteins keine Rolle spielte.

Die auch in diesen Poly(U)-Systemen mit rekonstituierten 30S Untereinheiten von *Str. tenebrarius* und *Str. tenjimariensis* zu beobachtende Stimulation bei höheren Gentamicin- beziehungsweise Kanamycin-Konzentrationen dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die reassozierte native 50S Untereinheit aus dem sensitiven *Str. lividans* stammte. Einmal wurde dadurch jeglicher Einfluß einer "resistenten" 50S Untereinheit ausgeschlossen und zum anderen waren diese Systeme viel aktiver als solche mit 50S Ribosomen von *Str. tenebrarius* oder *St. tenjimariensis* (vgl. Tab. 5).

3.6. Ergebnisse der Methylierungsversuche

Da die vorausgegangenen Rekonstitutionsexperimente die 16S rRNA als Träger der Aminoglykosid-Resistenz aller untersuchten Produzenten-Stämme ergeben hatte, war es naheliegend, nach einer sekundären Modifikation der 16S rRNA zu suchen. Die einzigen sekundären Modifikationen der rRNA von Bakterien, die überhaupt bekannt sind, sind Methylierungen verschiedener Basen (103). Das Fehlen der normalen Methylierung, wie im Falle von Kasugamycin-resistenten *E. coli* (48) oder eine zusätzliche Methylierung, wie sie bei *Thiostrepton*-Produzenten (44) und *Erythromycin*-Produzenten (38) gefunden wurden, kann zur Hochresistenz des Ribosoms führen. Bei der Suche nach einem methylierenden Enzym war aber zu bedenken, daß von verschiedenen möglichen Substraten ausgegangen werden muß, nämlich von reiner 16S rRNA, von Ribo-

nukleoproteinpartikeln mit verschiedener Proteinkomposition (LiCl-Partikel) und schließlich von intakten 30S Untereinheiten. Beispielsweise ist nackte 23S rRNA das beste Substrat für die Thiostrepton-Methylase (104), 1 M LiCl-Partikel sind ein wesentlich schlechteres und native 50S Untereinheiten überhaupt kein Substrat. Umgekehrt ist 16S rRNA kein Substrat, wohl aber 21S Core-Partikel, für die Methylase, deren Fehlen die Kasugamycin-Resistenz verursacht (48). Zu beachten ist ferner, daß diese Methyltransferasen ribosomal gebunden sein können (38), so daß als Rohextrakte nur S30 oder S100* in Frage kamen. Die Resultate eines typischen Methylierungsexperiments sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Test auf Methylaseaktivität des S30 Rohextrakts aus *M. purpurea*

Substrat	S30	an TCA-präzipitiertes Material gebundene Methylgruppen(cpm)
16S rRNA <i>M. purpurea</i>	-	395
16S rRNA <i>M. purpurea</i>	+	1 712
16S rRNA <i>M. melanosporea</i>	+	1 793
1 M LiCl-Core <i>M. melanosporea</i>	+	1 615
2 M LiCl-Core <i>M. melanosporea</i>	+	1 544
30S Ribosom <i>M. purpurea</i>	+	1 691
30S Ribosom <i>M. melanosporea</i>	+	1 597

Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie unter 2.8. beschrieben. Die Inkubationszeit betrug 45 min.

Ähnliche Versuche wurden auch mit Rohextrakten aus *M. melanospora* und *Str. lividans* und Substraten aus Produzenten-Stämmen durchgeführt, um eine mögliche Untermethylierung zu erfassen. Getestet wurden ferner Rohextrakte aus *M. grisea*, *M. sagamiensis*, *M. zionensis*, *Str. tenebrarius* und *Str. tenjimariensis*. Dabei wurde jedoch nie ein signifikanter Unterschied an eingebauten Methylgruppen zwischen Kontrollsubstrat aus dem Produzentenstamm, das ja vollständig methyliert sein sollte, und Substraten aus sensitiven Vergleichsstämmen gefunden. Eine *in vitro*-Methylaseaktivität konnte also nicht nachgewiesen werden; dies läßt jedoch nicht den Schluß zu, daß eine Methylierung der 16S rRNA als Resistenzmechanismus ausscheidet. Verschiedene Gründe, wie Instabilität des Enzyms, falsches Ionenmilieu im Testansatz, können den Nachweis der Aktivität eines solchen Enzyms *in vitro* verhindert haben.

3.7. Ergebnisse der Bindungsstudien

Ziel der Gleichgewichtsdialysen war es, zu untersuchen, ob ein nachweisbarer Unterschied der Bindung von Gentamicin an sensitive und hoch resistente Ribosomen besteht. Überraschenderweise war jedoch überhaupt kein Unterschied im Bindeverhalten der sensitiven und resistenten Ribosomen zu sehen (Abb. 21). 70S Ribosomen aus *M. melanospora* und *M. purpurea* banden identische Mengen Gentamicin, ebenso die 30S Untereinheiten, diese allerdings etwas weniger als die 70S Ribosomen. Die Gleichgewichtsdialysen wurden auch mit 50S Untereinheiten von beiden Stämmen durchgeführt; sie banden beide etwa so viel Gentamicin wie die 30S Partikel. In keinem Fall ließ sich eine absättigbare Bindestelle bestimmen. Gentamicin bindet anscheinend aufgrund seiner positiven Ladungen an alle exponierten RNA-Regionen des Ribosoms. Dies ist im Einklang mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen.

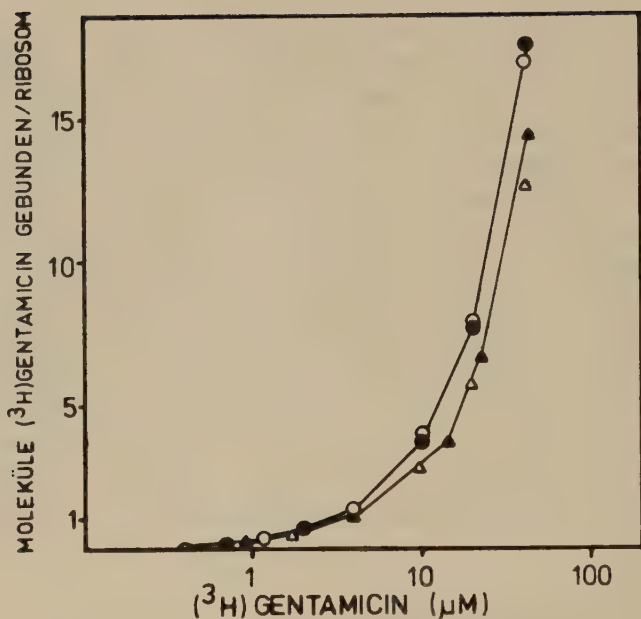


Abbildung 21:

Bindung von ³H-Gentamicin an sensitive und resistente Ribosomen in Abhängigkeit von der Antibiotikumskonzentration.

○: 70S *M. purpurea*

△: 30S *M. purpurea*

●: 70S *M. melanospora*

▲: 30S *M. melanospora*

3.8. Untersuchungen zur systematischen Stellung von *Str. tenebrarius*

Im Verlauf der Arbeiten mit *Str. tenebrarius* tauchten Zweifel auf, ob diese Art wirklich der Gattung *Streptomyces* zuzuordnen ist. Der erste Hinweis war, daß die in vitro-Polypeptidsynthese mit S100 oder S30 Rohextrakt von *Str. tenebrarius*, ähnlich wie mit Rohextrakt von *Nocardia*, durch Tris-Puffer nicht gehemmt wurde; dieser Puffer wirkt stark hemmend auf die

Polyphenylalaninsynthese mit Rohextrakt von Streptomyceten (Abb. 1; E. Cundliffe, persönliche Mitteilung).

Bei der Artbeschreibung durch Higgins und Kastner (52) waren nur morphologische und physiologische Merkmale (Verwertbarkeit verschiedener Zucker) herangezogen worden, biochemische Untersuchungen fehlten bisher völlig. Es erschien deshalb von Interesse, die systematische Stellung dieser Art näher zu bestimmen. Hierzu wurde die Zusammensetzung der Zellwand ermittelt sowie die Elektropherogramme der ribosomalen Proteine im Vergleich mit denen von Streptomyces und Nocardia analysiert.

3.8.1. Zellwandanalyse

Viele Arten aus der Gruppe der Actinomyceten können in morphologischer Hinsicht sehr stark variieren, auch die in dieser Arbeit verwendete, nicht sporulierende Variante von *Str. tenebrarius* wäre als *Nocardia* beschrieben worden, falls der Luftmycel bildende und sporulierende Elternstamm nicht bekannt wäre (52). Der Aufbau der Zellwand ist deshalb ein wesentlich genaueres Unterscheidungsmerkmal zwischen *Streptomyces* und *Nocardia* (105). Die charakteristischen Bestandteile der vier bei Actinomyceten gefundenen Zellwandtypen sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Charakteristische Bestandteile der Zellwand von Actinomyceten^a

Zellwandtyp	Diaminopimelinsäure meso- LL-		Glycin	Arabinose	Galaktose
I	-	+	+	-	-
II	+	-	+	-	-
III	+	-	-	-	-
IV	+	-	-	+	+

a: nach Gottlieb (105)

Die Gattung *Streptomyces* ist durch eine Zellwand vom Typ I, *Nocardia* durch den Besitz einer Zellwand vom Typ IV eindeutig charakterisiert. Das Arabinogalaktan kann aber bei einigen *Nocardia*-Arten fehlen (106).

Die quantitative Analyse der Aminosäuren und Amino Zucker des Totalhydrolysats der tryptisch gereinigten Zellwand von *Str. tenebrarius*, die in einem Aminosäureanalysator durchgeführt wurde (Abb. 22), ergab ein Molverhältnis von Glutaminsäure (Glu)

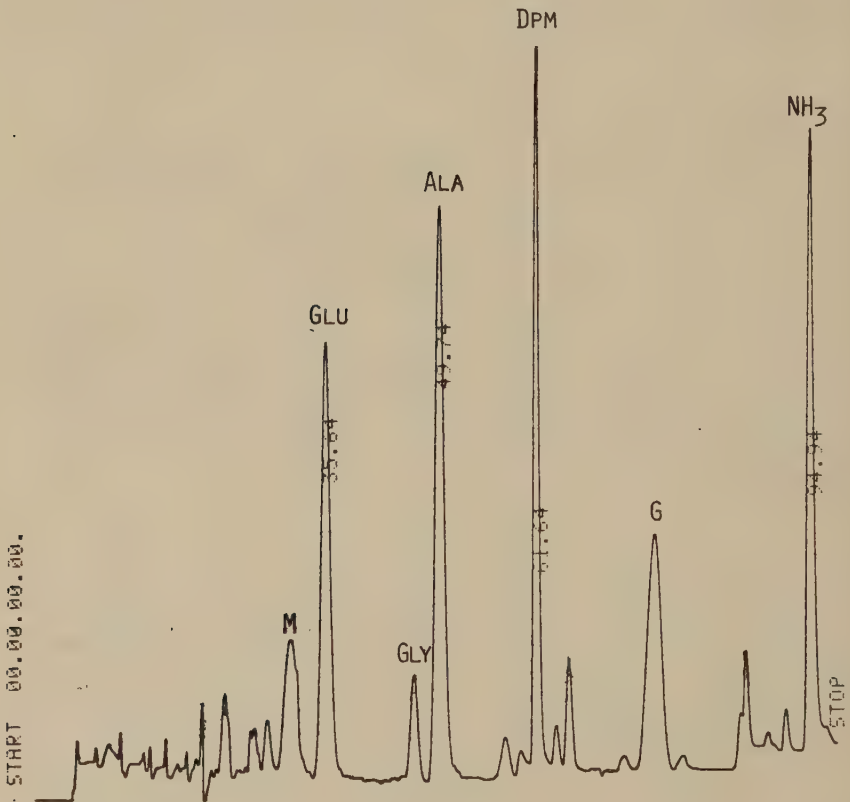


Abbildung 22:

Elutionsprofil eines Totalhydrolysats der Zellwand von *Str. tenebrarius*, aufgetrennt in einem Biotronic LC 6001-Aminosäure-analysator.

: Alanin (Ala) : Diaminopimelinsäure (Dpm) : Muraminsäure (M)
: Glukosamin (G) : NH_3 = 1:2:1:1:1:3. Das häufig als Kontamination auftretende Glycin scheint kein Bestandteil der Zellwand zu sein, da es nur in sehr geringer Konzentration nachgewiesen wurde. Die Diaminopimelinsäure wurde dünnschichtchromatographisch als meso-Form bestimmt. Der hohe Anteil an NH_3 läßt darauf schließen, daß sowohl die α -Carboxyl-Gruppe der D-Glutaminsäure als auch die COOH -Gruppe am D-Zentrum der Diaminopimelinsäure amidiert sind. Diese doppelte Amidierung ist charakteristisch für das Peptidoglykan der Gattung *Nocardia* (107). Aus den obigen Daten ergibt sich die in Abbildung 23 dargestellte Struktur des Peptidoglykans von *Str. tenebrarius*. Es handelt sich um das für *Nocardia* typische Murein.

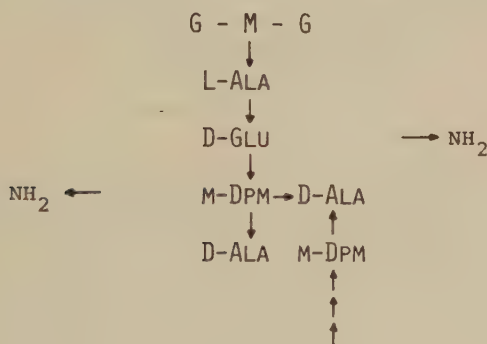


Abbildung 23:

Fragment der Primärstruktur eines direkt quervernetzten Peptidoglykans von *Nocardia* (nach Schleifer und Kandler [106]).

Zur Bestimmung der Komponenten der Zellwand-Polysaccharide wurden zwei Wege beschritten. Einmal wurden HF-Hydrolysate, in denen spezifisch Phosphoesterbindungen und labile glykosidische Bindungen gespalten sein sollten, nach Acetylierung (Abb. 24 A), nach Reduzierung und Acetylierung (Abb. 24 B) und nach Säure-

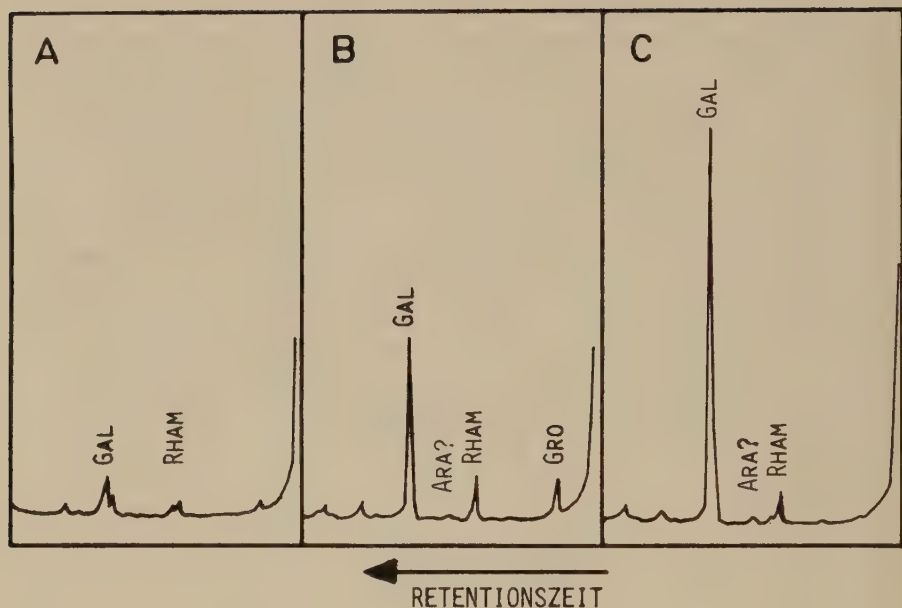


Abbildung 24:

Elutionsprofile der HF-Hydrolysate der Zellwand von *Str. tenebrarius*, aufgetrennt in einem Packard-Gaschromatographen 428. A: HF-Hydrolysat, acetyliert; B: HF-Hydrolysat, reduziert und acetyliert; C: HF-Hydrolysat, sauer hydrolysiert (2 N HCl, 3 h, 100°C), reduziert und acetyliert.

Die Bestimmung der Peaks erfolgte anhand eines mitgeführten Standards.

Abkürzungen: Arabinose (ARA), Erythrit (ERY), Galaktosamin (GALN), Galaktose (GAL), Glukosamin (G), Glukose (GLC), Glycerin (GRO), Mannose (MAN), Muraminsäure (M), Rhamnose (RHA), Ribitol (RIB)

Hydrolyse (2 N HCl, 3 h, 100°C), Reduzierung und Acetylierung (Abb. 24 C) gaschromatographisch aufgetrennt. Die Hauptkomponente ist Galaktose, außerdem etwas Rhamnose und Glycerin (und Spuren von Arabinose?). Nach zusätzlicher Säure-Hydrolyse (Abb. 23 C) wird mehr Galaktose gefunden als nach ausschließlicher HF-Behandlung (Abb. 24 B); das deutet darauf hin, daß HF nicht alle Bindungen spaltet. Der Doppelpeak der nicht reduzierten Galaktose (Abb. 24 A) entsteht durch die zwei Isomere der acetylierten Form und zeigt, daß wirklich Galaktose und nicht

Galaktitol vorliegt.

Andererseits wurden die Bestandteile der Polysaccharide in sauren Hydrolysaten (2 N HCl, 3 h, 100°C) von Zellwänden (ohne vorherige HF-Behandlung) gaschromatographisch bestimmt (Abb.25). Neben aus dem Murein freigesetzter Muraminsäure und Glukosamin wurden wiederum Galaktose sowie unbedeutende Mengen Mannose, Rhamnose und Glycerin gefunden.

Das für die Nocardien typische Arabinogalaktan fehlt also bei *Str. tenebrarius*. Trotzdem scheint diese Art eher den Nocardien zuzuordnen zu sein. Einige Autoren (108) verwenden als alleiniges Kriterium ("Dogma") zur Unterscheidung von *Nocardia* und *Streptomyces* die Isomerenform der Diaminopimelinsäure. Alle früher der Gattung *Streptomyces* zugerechnete Arten, die meso-Diaminopimelinsäure besitzen, wurden der Gattung *Nocardia* zugeordnet, obwohl sich darunter sporulierende Organismen, zum Beispiel *N. capreola* sowie mehrere Arten, bei denen kein Arabinogalaktan nachgewiesen werden konnte, befinden.

3.8.2. Auswertung der Elektropherogramme ribosomaler Proteine

Die Verwandtschaftsverhältnisse von Bakterien lassen sich auch durch den Vergleich ihrer ribosomalen Proteine ermitteln (109, 110). Die Analyse der Elektropherogramme der ribosomalen Proteine der 30S Untereinheit von *Str. tenebrarius* im Vergleich zu der von *Str. lividans* und *Str. tenjimariensis* einerseits und *N. asteroides* und "*Nocardia*" *calcareo* andererseits sollte ein weiterer Hinweis sein, ob diese Art der Gattung *Nocardia* oder *Streptomyces* nähersteht. Erst nach Abschluß der Experimente für diese Arbeit stellte sich heraus, daß nach neueren Untersuchungen "*Nocardia*" *calcareo* der Gattung *Rhodococcus* zuzuordnen ist (Dr. Kroppenstedt, persönliche Mitteilung).

Die Elektropherogramme der Proteine von *Str. lividans* und *Str. tenjimariensis* (Abb. 26 B und 26 C) weisen untereinander nur wenige Unterschiede auf (mit offenen Pfeilen in den Abbildungen

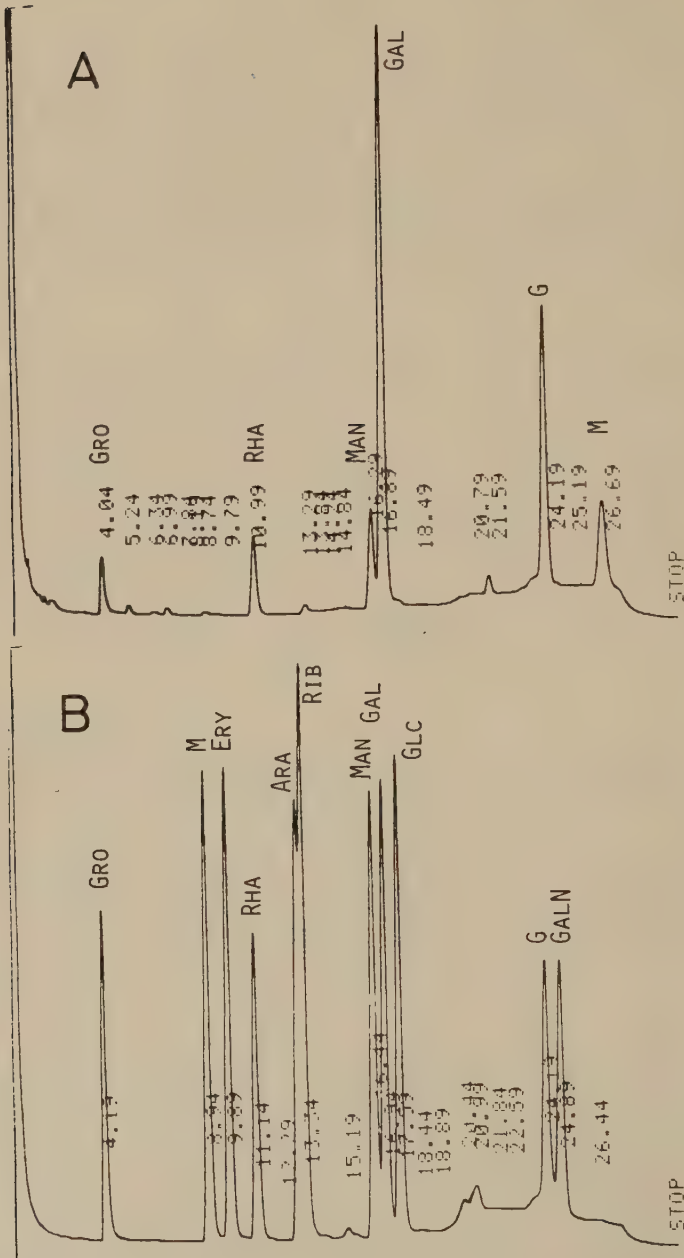


Abbildung 25:

Elutionsprofil eines Säure-Hydrolysats (2 N HCl, 3 h, 100°C) der Zellwand von *Str. tenebrarius* (A) und eines Standard-Zuckergemisches (B), aufgetrennt in einem Packard-Gaschromatographen 428. (Abkürzungen siehe Abbildung 24)

gekennzeichnet), das Proteinmuster von *Str. tenebrarius* (Abb. 26 A) differiert beträchtlich (Kennzeichnung durch geschlossene Pfeile) und ähnelt, besonders im Bereich der kleineren Proteine dem von "*Nocardia*" *calcareo* (Abb. 26 E). Allerdings sind die Unterschiede zu den *Streptomyces*-Arten einerseits und zu *Nocardia*/*Rhodococcus* andererseits so groß, daß sich eine Zuordnung zur einen oder anderen Gruppe aufgrund der ribosomalen Proteinmuster verbietet. Betrachtet man aber daneben noch die Ergebnisse der Zellwandanalyse, so wird deutlich, daß *Str. tenebrarius* wohl nicht mehr als *Streptomyces* bezeichnet werden sollte; ob eine Zuordnung zu einer der nach der Neuordnung der *Nocardiaceen* durch Goodfellow und Minnikin (107) zahlreichen Gattungen dieser Familie zu erfolgen hat oder ob für *Str. tenebrarius* und ähnliche Organismen eine eigene systematische Gruppe gefordert werden muß, bedarf weiterer eingehender Untersuchungen.

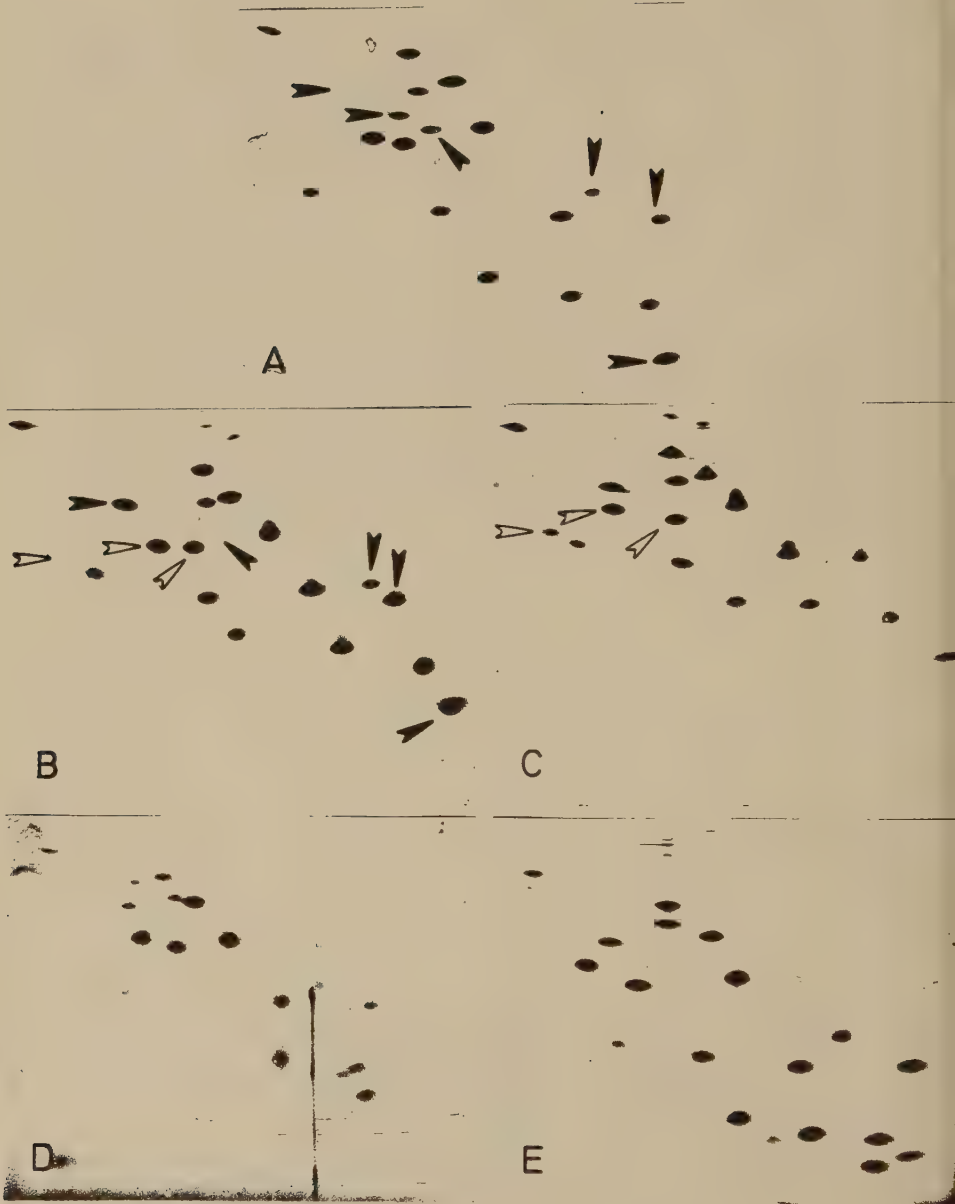


Abbildung 26:

Zweidimensionale Elektropherogramme der ribosomalen Proteine der 30S Untereinheit von *Str. tenebrarius* (A), *Str. lividans* (B), *St. tenjimariensis* (C), *N. asteroides* (D) und *N. (=Rhodococcus) calcarrea* (E).

4. DISKUSSION

Vergleich der ribosomalen Resistenzprofile

Ein erster Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand im Vergleich der Resistenzspektren derjenigen Aminoglykosid-Produzenten, die resistente Ribosomen besitzen. Es ließen sich drei verschiedene Resistenztypen nachweisen, die in Tabelle 10 dargestellt sind: Sehr ähnlich sind die Resistenzprofile der Micromonospora-Gruppe und von *Str. tenebrarius*; sie unterscheiden sich nur durch die Neomycin-Resistenz von *Str. tenebrarius*. Ein völlig anderes Resistenzspektrum liegt bei *Str. tenjimariensis* vor; es fällt vor allem auf, daß dieser Organismus gegen verschiedene Aminoglykoside (z.B. Gentamicin und Neomycin) intermediäre Resistenzen besitzt, während sonst nur Hochresistenz oder volle Sensitivität der Ribosomen gegen einzelne Aminoglykoside beobachtet wurde.

Ein Vergleich der Strukturformeln der wichtigsten Deoxystreptamin-Aminoglykoside (Abb. 27) zeigt, daß sich keine strukturelle Komponente erkennen läßt, die mit den ribosomalen Resistenzprofilen korrelieren würde.

Obwohl Paromomycin von der Struktur her Neomycin sehr ähnlich ist (Abb. 27 C), liegt auch bei *Str. tenebrarius* (Neomycin-resistent) keine Resistenz gegen Paromomycin vor. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lando et al. (111) überein, die für Paromomycin nur eine einzige Bindestelle an 70S Ribosomen beschrieben, um die weder Streptomycin noch Gentamicin, Kanamycin oder Neomycin kompetitieren. Erstaunlich ist aber andererseits, daß gegen Apramycin (Abb. 27 D), das sich sowohl durch seine einzigartige Struktur als auch durch seine Wirkweise auf die Proteinsynthese - es induziert in hohen Konzentrationen nur sehr geringes Misreading (112) - von den anderen Deoxystreptamin-

Tabelle 10: Vergleich der ribosomalen Resistenzspektren der untersuchten Aminoglykosid-Produzenten

Antibiotikum	<i>M. grisea</i>	<i>M. inyoensis</i>	<i>M. purpurea</i>	<i>M. rhodorangea</i>	<i>M. sagamiensis</i>	<i>M. zionensis</i>	<i>Str. tenebrarius</i>	<i>Str. tenjimariensis</i>
4,6-disubstituierte								
Deoxystreptamine								
Gentamicin				R ^a			R	SR
Kanamycin				R ^a			R ^b	R
Sisomicin				R ^a			n.u.	R
4,5-disubstituierte								
Deoxystreptamine								
Neomycin				S ^a			R	SR
Paromomycin				S ^a			S	S
Andere								
Apramycin				n.u.			R	R
Streptomycin				S ^a			S ^b	S ^c

R: resistent, vollständige Hemmung der Polyphenylalaninsynthese bei Konzentrationen von 100 µg/ml und mehr
 SR: schwach resistent, vollständige Hemmung ab 10 µg/ml
 S: sensitiv, vollständige Hemmung bereits bei 1 µg/ml
 n.u.: nicht untersucht

- a) Ergebnisse für *M. purpurea* von Piendl und Böck (49), für die anderen Micromonospora-Arten diese Arbeit
 b) Ergebnisse von Yamamoto et al. (21)
 c) Ergebnis von Yamamoto et al. (50)

Aminoglykosiden unterscheidet, bei *Str. tenebrarius* und *Str. tenjimariensis* eine ribosomale Kreuzresistenz vorliegt.

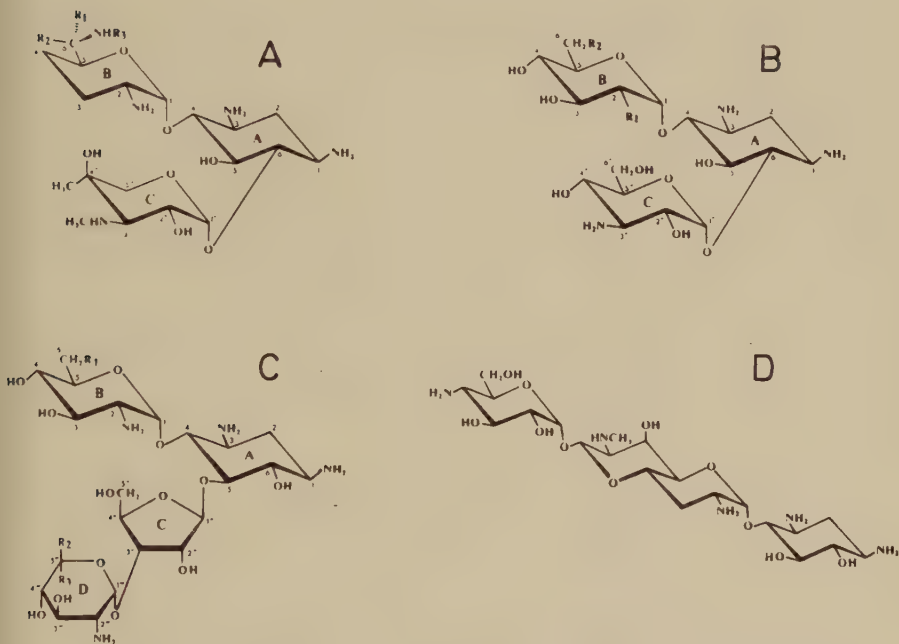


Abbildung 27:

Strukturen einiger wichtiger Aminoglykoside nach Okuda und Ito (113):

- A: Gentamicin C_1 ($R_1 = H$, $R_2 = R_3 = CH_3$)
 Gentamicin C_{1a} ($R_1 = R_2 = R_3 = H$)
 Gentamicin C_{2a} ($R_1 = H$, $R_2 = CH_3$, $R_3 = H$)
 Gentamicin C_{2b} , Sagamicin ($R_1 = R_2 = H$, $R_3 = CH_3$)
 Sisomicin ist Gentamicin C_{1a} mit einer Doppelbindung in 4', 5'-Position.
- B: Kanamycin A ($R_1 = NH_2$, $R_2 = OH$)
 Kanamycin B ($R_1 = R_2 = NH_2$)
- C: Neomycin B ($R_1 = NH_2$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_2NH_2$)
 Neomycin C ($R_1 = NH_2$, $R_2 = CH_2NH_2$, $R_3 = H$)
 Paromomycin I ($R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_2NH_2$)
- D: Apramycin

An dieser Stelle sei auch noch kurz auf die biologische Relevanz der in vitro-Daten eingegangen, die alle in einem rein elongierenden Polypeptidsynthesesystem ermittelt wurden; ein initiiertes System stand für Actinomyceten nicht zur Verfügung. Deoxystreptamin-Aminoglykoside beeinflussen nämlich auch verschiedene Schritte der Initiation (114). Trotzdem scheint das verwendete Poly(U)-abhängige Polyphenylalanin-Synthesesystem geeignet zu sein, den Effekt dieser Aminoglykoside auf die Proteinsynthese darzustellen:

1. Tai und Davis (67) verglichen den Effekt von Gentamicin auf initiierte Ribosomen und gereinigte Polysomen, die nur eine Kettenelongation, aber keine Reinitiation mehr ausführen (115), und fanden für beide Fälle einen parallel verlaufenden, typisch triphasischen Hemmeffekt. Mit initiierten Ribosomen verlief diese Hemmung nur etwas drastischer.
2. Das durch diese Aminoglykoside in vivo (116) und in initiierten in vitro-Proteinsynthesesystemen (69) induzierte Misreading läßt sich auch im Poly(U)-System gut zeigen (55).
3. Die strikte Korrelation der minimalen Hemmkonzentrationen mit den in vitro-Resistenzprofilen derjenigen Produzenten, die nicht über zusätzliche modifizierende Enzyme verfügen, also die *Micromonospora*-Spezies und *Str. tenjimariensis*, sind ein weiterer Beweis für die Aussagekraft der im Poly(U)-System ermittelten Daten.

Lokalisation der Resistenz in der 30S Untereinheit

Mutationen in ribosomalen Proteinen, die einen veränderten Phänotyp (Resistenz, Abhängigkeit, Hypersensitivität) gegenüber verschiedenen Aminoglykosiden bewirken, betreffen fast ausschließlich Proteine der kleinen Untereinheit. Sie sind zusammen mit den wenigen bekannten Veränderungen der 16S rRNA, die ebenfalls

eine Resistenz hervorrufen können, in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Veränderungen ribosomaler Komponenten, die den Aminoglykosid-Phänotyp beeinflussen

Antibiotikum	Veränderte Komponente	Eigenschaft	Referenz
Spectinomycin	Protein S5	Resistenz	(117)
	16S rRNA	Resistenz	(118)
Kasugamycin	16S rRNA-Methylase	Resistenz	(48)
	Protein S2	Resistenz	(119)
	Proteine S9, S18, L11	Abhängigkeit/ Resistenz	(120)
Streptomycin	Protein S12	Resistenz	(61)
	Protein S12	Abhängigkeit	(121)
	Protein S8	Abhängigkeit	(122)
	Protein S4	Hypersensitivität	(78)
	Protein S5	Hypersensitivität	(123)
Gentamicin	Protein L6	partielle Resistenz	(100)
Kanamycin	Protein S12	partielle Resistenz	(124)
	30S Untereinheit	Resistenz	(70)
	50S Untereinheit	Resistenz	(70)
Neomycin	30S Untereinheit	partielle Resistenz	(125)
Paromomycin	15S rRNA in Hefemito- chondrien	Resistenz	(126)

In der 30S oder 50S Untereinheit sind Mutationen lokalisiert, die - allerdings nur niedrige - Resistenzen gegen Antibiotika der Gentamicin-Kanamycin-Neomycin-Gruppe bewirken. Auf Effekte dieser Antibiotika auf beide Untereinheiten lassen auch die Ergebnisse von Campuzano und Mitarbeitern (127) schließen; sie fanden, daß disubstituierte Deoxystreptamine durch Wechselwirkung mit der 50S Untereinheit die Bindung von Elongationsfaktor G ans Ribosom stabilisieren und die Translokation hemmen, während die Wirkung auf die 30S Untereinheit ebenfalls in einer Hemmung der Translokation sowie in der Induktion von Misreading besteht. Schließlich konnte auch gezeigt werden, daß an der Bindung von Dibekacin, einem Kanamycin-Derivat, neben L6 - einem typischen Interphase-Protein (128) - auch ein Protein der kleinen Untereinheit, S9, beteiligt ist (129).

Der Befund, daß eine Eigenschaft der 30S Untereinheit allein die Hochresistenz des Ribosoms determiniert, steht nun anscheinend im Widerspruch zu den oben zitierten Resultaten. Dennoch lassen auch die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, daß die 2-Deoxystreptamin-Aminoglykoside Bindungsstelle(n) an der 50S Untereinheit besitzen. Sie üben zwar keinen Einfluß auf den Resistenzcharakter des gesamten Ribosoms aus, sind aber für die Stimulationsphase der typischen dreiphasigen Wirkung dieser Aminoglykoside (67) verantwortlich.

Eine Veränderung der 16S rRNA als Resistenzdeterminante

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß eine Eigenschaft der 16S rRNA den Resistenzcharakter der Ribosomen aller hier untersuchten Aminoglykosid-Produzenten bestimmt. Die Rekonstitutionsexperimente ergaben eindeutig, daß ribosomale Proteine keinen Einfluß auf die Resistenz haben. Die 16S rRNA scheint also die entscheidende Komponente für die Bindungsstelle(n) der 2-Deoxystreptamin-Aminoglykoside zu sein.

Es ist zwar schon länger bekannt, daß die 16S rRNA bei der Bindung von Streptomycin eine Rolle spielt (63). Die RNA schien aber für die Spezifität der Bindung nicht von größerer Bedeutung zu sein, da ein veränderter Phänotyp (Resistenz, Abhängigkeit, Hypersensitivität) durch Mutationen in ribosomalen Proteinen bestimmt werden kann (Tab. 11).

Die Grundschwierigkeit, die Rolle der rRNA bei der Bindung und Wirkung antibiotisch aktiver Substanzen am Ribosom zu untersuchen, bestand wohl darin, daß keine entsprechenden rRNA-Mutanten zur Untersuchung zur Verfügung standen. In den meisten Bakterien liegen die rRNA-Operons in höherer Kopienzahl vor, bei *E. coli* zum Beispiel sind es sieben (130), und eine Mutation in einem einzelnen Gen führt deshalb nicht zu einem veränderten Phänotyp.

Erst nachdem es möglich war, rRNA-Gene auf Multicopy-Plasmiden zu klonieren, konnten auch Antibiotika-resistente Mutanten isoliert werden. Die auf dem Plasmid lokalisierten, mutierten rRNA-Gene, die Resistenz determinieren, liegen in deutlicher Überzahl in der Zelle vor, so daß solche Stämme partiell resistent werden. Neben einer 16S rRNA-Mutation (118), die eine Spectinomycin-Resistenz bewirkt, ist auch eine Erythromycin-Resistenz aufgrund einer Mutation in der 23S rRNA (131) kloniert worden.

Im Mitochondrien-Genom liegt nur eine Kopie der ribosomalen RNA-Gene vor, so daß rRNA-Mutationen direkt phänotypisch sichtbar werden. Ein Beispiel hierfür ist die nahe dem 3'-Terminus der 15S rRNA aus Hefemitochondrien, die der bakteriellen 16S rRNA homolog ist, lokalisierte Paromomycin-Resistenz (126).

Zwei weitere Fälle sind beschrieben, in denen durch eine 16S rRNA-Veränderung eine Antibiotikums-Resistenz determiniert wird: die bereits erwähnten *ksgA*-Mutanten von *E. coli*, die aufgrund einer Untermethylierung der 16S rRNA Kasugamycin-resistent sind (48) und Mutanten von *Mycobacterium smegmatis*, die infolge

einer nicht näher charakterisierten Veränderung der 16S rRNA (oder auch der 23S rRNA) gegen Viomycin resistent sind (132).

Art der Veränderung der 16S rRNA

Von besonderem Interesse ist die Frage nach der Art der 16S rRNA-Veränderung. Zwei Mechanismen sind grundsätzlich möglich:

1. Mutationen in der 16S rRNA (einzelne Basenaustausche) oder
2. eine sekundäre Modifikation ähnlich den bei den Thiostrepton- und Erythromycin-Produzenten gefundenen Methylierungen der 23S rRNA (44, 40).

Man muß bei diesen Überlegungen davon ausgehen, daß auch bei Streptomyceten die rRNA-Gene in mehreren Kopien vorliegen, genauere Daten fehlen aber hierzu. Eine Mutation in dem Bereich der 16S rRNA-Sequenz, der mit der Sensitivität/Resistenz gegen disubstituierte Deoxystreptamin-Aminoglykoside korreliert, müßte in (fast) allen dieser rRNA-Gene vorgelegen haben, ehe eine Antibiotikums-Produktion möglich gewesen wäre. Dies erscheint unwahrscheinlich.

Der zweite mögliche Weg - die Präsenz eines rRNA modifizierenden Enzyms - erscheint aus diesem Grunde viel wahrscheinlicher. Das wird auch dadurch bestätigt, daß die drei unterschiedlichen Resistenzen aus *Micromonospora*, *Str. tenebrarius* und *Str. tenjimariensis* in *Str. lividans* clonierbar sind (E. Cundliffe, persönliche Mitteilung), wobei die clonierten DNA-Stücke zu klein sind, um für eine 16S rRNA zu codieren. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Nakano und Mitarbeiter (53), die in Clonen von *Streptomyces*, die DNA-Fragmente aus dem Kanamycin-Produzenten *Str. kanamyceticus* trugen, Kanamycin-resistente Ribosomen fanden, die übrigens dasselbe Resistenzprofil haben wie die in dieser Arbeit untersuchten Ribosomen der *Micromonospora*-Gruppe.

Daß in den in dieser Arbeit beschriebenen in vitro-Methylierungsversuchen keine positiven Ergebnisse erzielt werden konnten, spricht nicht gegen rRNA-modifizierende Enzyme als Resistenzmechanismus. Aus verschiedenen Gründen kann eine Methylase-Aktivität nicht entdeckt worden sein. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß nicht eine Methylierung, sondern irgendeine andere posttranskriptionelle Modifikation - man denke an die vielen bei tRNAs beschriebenen - die vorliegende Resistenz determiniert.

Konsequenzen für den Wirkungsmechanismus der disubstituierten Deoxystreptamin-Aminoglykoside

In den in dieser Arbeit untersuchten Aminoglykosid-Produzenten wurden erstmals Ribosomen gefunden, die gegen disubstituierte Deoxystreptamine hoch resistent sind, und die dadurch neue Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus dieser Antibiotika vermitteln können.

Alle bisher gesammelten Daten zur Bindung und Wirkweise der Aminoglykoside der Kanamycin-Gentamicin-Neomycin-Gruppe deuten übereinstimmend auf zwei oder mehr Bindestellen am Ribosom hin. Es soll nun hier versucht werden zu zeigen, daß durchaus die Möglichkeit besteht, daß auch für diese Antibiotika nur eine spezifische Bindestelle vorhanden ist.

1. Ein wichtiges Argument für die Existenz von mehr als einer Bindungsstelle am Ribosom ist das Fehlen von hoch resistenten Einschnitt-Mutanten (66, 100). Diese Überlegung ist aber nur für Bindestellen zutreffend, die durch eine Mutation in einem einzelnen ribosomalen Protein so verändert werden können, daß das Antibiotikum, wie für Spectinomycin, Streptomycin und andere (Tab. 11) gezeigt wurde, nicht mehr binden kann. Als Beispiel für den Aufbau einer solchen Bindestelle seien die ribosomalen Komponenten genannt, deren

Veränderung eine Resistenz gegen Erythromycin bestimmen kann:

- a) Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 oder L22 (133);
- b) Dimethylierung einer Base der 23S rRNA (40, 43) oder auch eine Mutation in der 23S rRNA (131).

Die Bindestelle(n) für Antibiotika der Gentamicin-Kanamycin-Neomycin-Gruppe scheinen anderer Art zu sein, da es bisher auch in Mehrschritt-Mutationsprogrammen nicht gelang, Ribosomen zu finden, die aufgrund mehrerer Mutationen in ribosomalen Proteinen hoch resistent gegen diese Antibiotika gewesen wären (9, 100, 71). Falls wirklich mehrere Bindestellen des oben beschriebenen Typs vorlägen, sollten auch resistente Ribosomen zu erzeugen sein.

Es besteht aber die Möglichkeit, daß die Bindung an die rRNA so dominierend ist, daß kein an der Bindung beteiligtes oder benachbartes Protein so durch Mutation verändert werden kann, daß die Bindestelle für das Antibiotikum unzugänglich wird. Ein solcher Fall liegt bei dem Antibiotikum Thiostrepton vor, das eine einzige, schwach affine Bindestelle an der 23S rRNA besitzt, mit wesentlich höherer Affinität aber an einen Komplex aus 23S rRNA und ribosomalem Protein L11 bindet (134). In Ribosomen von Thiostrepton-resistenten Mutanten von *Bacillus megaterium* (77) und *Bacillus subtilis* (135) fehlte das L11 homologe Protein jeweils völlig, resistente Ribosomen mit mutiertem L11 wurden nie gefunden. Wäre der Verlust von L11 letal, würde man auch diese Thiostrepton-resistenten Mutanten nicht finden. Eine ähnliche, entscheidende Funktion könnte die rRNA auch bei der Bindung dieser Aminoglykoside haben.

- 2. Das erst durch hohe Konzentrationen von Deoxystreptamin-Aminoglykosiden stark stimulierte Misreading kann nur durch eine Wechselwirkung weiterer Moleküle des Antibiotikums mit dem Ribosom erklärt werden.

Durch die Bindung von Aminoglykosiden ans Ribosom wird die Konformation des Ribosoms verändert (136, 137, 125). Diese Konformationsänderung könnte eine entscheidende Rolle bei der Besetzung der weiteren Bindestellen spielen. Es scheint notwendig zu sein, daß zuerst die "spezifische" Bindestelle am Ribosom besetzt wird, so daß durch eine dabei verursachte Konformationsänderung des Ribosoms die für das hohe Misreading benötigten weiteren Bindestellen zugänglich werden. Dies würde bedeuten, daß die "sekundären" Bindeorte nicht verändert werden müssen, um eine Hochresistenz des Ribosoms zu erzielen.

Ein solcher kooperativer Effekt ist für das Antibiotikum Virginiamycin (138) nachgewiesen. In diesem Falle ermöglicht erst die durch die Bindung der Komponente MS bewirkte Strukturveränderung des Ribosoms die Bindung der zweiten Komponente VS.

3. Die pleiotropen Effekte, die disubstituierte Deoxystreptamine auf die Polypeptidsynthese ausüben (Einfluß auf die Initiation, Induktion von Misreading, Hemmung der Translokation) müssen nicht mit mehreren Bindestellen erklärt werden, da ja auch Streptomycin ähnlich viele Schritte der Proteinsynthese beeinflusst.

Aus den übereinstimmenden in vivo- und in vitro-Resistenzspektren ergibt sich, daß drei verschiedene Resistenzmechanismen in den untersuchten Produzenten-Stämmen vorliegen, also auch drei unterschiedliche Typen von 16S rRNA-Veränderungen zu postulieren sind. Vermutlich sind sie in einer durch die Tertiärstruktur der RNA bestimmten engen Nachbarschaft zu suchen; so wären die weitgehenden Überlappungen der Resistenzprofile leicht zu erklären. Vielleicht liegen ähnliche Verhältnisse vor wie in Chloramphenicol-resistenten Mitochondrien, wo vier verschiedene, einzelne Basenaustausche in der der 23S rRNA homologen RNA, die alle im gleichen Loop

lokalisiert werden konnten, jeweils die Chloramphenicol-Resistenz bestimmen (139, 140).

Es kann zur Zeit nicht ausgeschlossen werden, daß mehrere Positionen der 16S rRNA (durch ein oder mehrere Enzyme) modifiziert vorliegen, durch deren Verteilung die jeweiligen Resistenzprofile der Ribosomen der verschiedenen Aminoglykosid-Produzenten determiniert werden. Die Analyse resistenter Clone von *Str. lividans* mit DNA-Fragmenten aus den Produzenten wird weitere Ergebnisse erbringen, die zur Lösung dieses Problems beitragen.

Praktische Bedeutung

Die in dieser Arbeit untersuchten Wirkortresistenzen sind - nimmt man die Resistenzhöhe als alleiniges Kriterium - wesentlich effizienter als die bei den Aminoglykosid-Produzenten viel weiter verbreiteten Resistenzen durch Aminoglykoside inaktivierende Enzyme.

Da diese ribosomalen Resistenzen clonierbar sind (53, E. Cundliffe, persönliche Mitteilung), könnten sie als Resistenzmarker beim Clonieren in Streptomyceten Bedeutung erlangen. Der bisher meist verwendete Thiostrepton-Marker ist problematisch, da dieses Antibiotikum sehr teuer und aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit schlecht zu handhaben ist.

Die Höhe der Eigen-Resistenz eines Antibiotikums-Produzenten ist auch für die Menge des von ihm produzierten Antibiotikums von Bedeutung. Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem Resistenzgrad und der Höhe der Antibiotikumsproduktion (141, 142, 25). So könnten diese ribosomalen Resistenzen bei der Selektion und Konstruktion von Hochproduzenten-Stämmen ebenso eine große Rolle spielen wie bei der Entwicklung neuer Screening Programme.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bakterien, die antibakteriell aktive Antibiotika produzieren, bedürfen besonderer Mechanismen, um sich vor ihrem eigenen Produkt zu schützen. Bei den Aminoglykosid-Produzenten sind sogenannte modifizierende Enzyme, die das Antibiotikum inaktivieren, weit verbreitet. Daneben wurden in letzter Zeit auch drei Arten beschrieben, die eine Veränderung des Wirkortes der Aminoglykoside, also resistente Ribosomen, aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit sollten diese ribosomalen Resistenzen vergleichend charakterisiert und die die Resistenz determinierende ribosomale Komponente bestimmt werden.

Die Effekte der Aminoglykoside auf die Proteinsynthese an sensiblen und resistenten Ribosomen wurden mit Hilfe eines Poly(U)-abhängigen *in vitro*-Translationssystems untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Alle untersuchten *Micromonospora*-Arten, die 4,6-disubstituierte Deoxystreptamine produzieren (insgesamt sechs Spezies), besitzen dasselbe ribosomale Resistenzprofil, das sich nur wenig von dem des Nebramycin-Produzenten *Str. tenebrarius*, jedoch deutlich von dem des Istamycin-Produzenten *Str. tenjimariensis* unterscheidet. Bei den Arten, die keine zusätzlichen modifizierenden Enzyme haben (*Micromonospora*, *Str. tenjimariensis*) korrelieren die ribosomalen Resistenzspektren exakt mit den minimalen Hemmkonzentrationen der Aminoglykoside *in vivo*.
2. In allen Fällen determiniert die ribosomale 30S Untereinheit allein die ribosomale Resistenz.
3. In Rekonstitutionsexperimenten, in denen die 16S rRNA aus

resistenten Ribosomen mit Totalprotein der 30S Untereinheit von sensitiven Vergleichsstämmen - und umgekehrt - rekonstituiert wurde, konnte gezeigt werden, daß eine Eigenschaft der 16S rRNA die Resistenz determiniert. Ribosomale Proteine haben keinen Einfluß darauf.

Damit wurde erstmals nachgewiesen, daß die 16S rRNA ein sehr wichtiger Bestandteil des Binde- und Wirkortes der Aminoglykoside der Gentamicin-Kanamycin-Neomycin-Gruppe ist. Dies ist außerdem der erste ribosomale Selbstschutzmechanismus in Produzenten, der auf eine Veränderung der 16S rRNA zurückgeht.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß *Str. tenebrarius* aufgrund seiner Zellwandstruktur und anderer Eigenschaften nicht mehr zur Gattung *Streptomyces* gestellt werden sollte. Dies verdeutlicht, daß die ribosomalen Resistenzen bei Aminoglykosid-Produzenten nicht in einer phylogenetisch einheitlichen Gruppe vorkommen.

6. LITERATUR

- (1) Davis BD, Maas WK (1952) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 775-785
- (2) Vining LC (1979) Adv. Appl. Microbiol. 25, 147-168
- (3) Cundliffe E (1984) British Medical Bulletin 40, 61-67
- (4) Davies J, Smith DJ (1978) Ann. Rev. Microbiol. 32, 469-518
- (5) Davies J, Kagan SA (1977) In: R-Factors: Their Properties and Possible Control (Drews J, Högenauer G, ed.), S. 207-215. Springer-Verlag, New York
- (6) Bryan LE (1982) In: Bacterial resistance and susceptibility to chemotherapeutic agents, S. 147-150. Cambridge University Press, Cambridge
- (7) Kagan SA (1981) In: Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids (Levy SB, Clowes RC, Koenig EL, eds.), S. 619. Plenum Press, New York, London
- (8) Bryan LE, Kwan S (1983) Antimicrob. Agents Chemother. 23, 835-845
- (9) Ahmad MH, Rechenmacher A, Böck A (1980) Antimicrob. Agents Chemother. 18, 798-806
- (10) Bryan LE, Van den Elzen HM (1976) Antimicrob. Agents Chemother. 9, 928-938
- (11) Benveniste R, Davies J (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2276-2280

- (12) Thompson CJ, Gray GS (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5190
- (13) Gray GS, Fitch WM (1984) Molecular Biology and Evolution 1, in press
- (14) Cella R, Vining LC (1975) Can. J. Microbiol. 21, 463-472
- (15) Sugiyama M, Sakamoto H, Mochizuki H, Nimi O, Nomi R (1983) J. Gen. Microbiol. 129, 1683-1687
- (16) Piwowarski JM, Shaw PD (1979) Antimicrob. Agents Chemother. 16, 176-182
- (17) Ono H, Cramer R, Hintermann G, Hütter R (1983) J. Gen. Microbiol. 129, 529-537
- (18) Davies J, Houk L, Yagisawa M, White TJ (1979) In: Genetics of Industrial Microorganisms (Sebek OK, Laskin AI, ed.), S. 166-169. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- (19) Dowding JE (1979) FEMS Microbiology Letters 6, 95-98
- (20) Yamaguchi M, Mitsuhashi S, Kobayashi F, Zenda H (1974) J. Antibiotics 27, 507-515
- (21) Yamamoto H, Hotta K, Okami Y, Umezawa H (1982) J. Antibiot. 35, 1020-1025
- (22) Leboul J, Davies J (1982) J. Antibiot. 35, 527-528
- (23) Dowding JE (1979) J. Gen. Microbiol. 115, 385-389
- (24) Hotta K, Yamamoto H, Okami Y, Umezawa H (1981) J. Antibiot. 34, 1175-1182

- (25) Hotta K, Takahashi A, Okami Y, Umezawa H (1983) J. Anti-biot. 36, 1789-1791
- (26) Sugiyama M, Kobayashi H, Nimi O, Nomi R (1980) FEBS Letters 110, 250-252
- (27) Sugiyama M, Nimi O, Nomi R (1980) J. Gen. Microbiol. 121, 477-478
- (28) Thompson CJ, Skinner RH, Thomposon J, Ward JM, Hopwood DA, Cundliffe E (1982) J. Bacteriol. 151, 678-685
- (29) Cella R, Vining LC (1974) Can. J. Microbiol. 20, 1591-1597
- (30) Nimi O, Ito G, Sueda S, Nomi R (1971) Agric. Biol. Chem. 35, 848-855
- (31) Sugiyama M, Mochizuki H, Nimi O, Nomi R (1981) J. Anti-biot. 34, 1183-1188
- (32) Sugiyama M, Mochizuki H, Nimi O, Nomi R (1981) Bio-technol. Letters 3, 357-362
- (33) Demain AL, Inamine E (1970) Bacteriol. Rev. 34, 1-19
- (34) Rinehart KL, Shoshane R (1976) J. Antibiot. 29, 319-353
- (35) Maier S, Grisebach H (1979) Biochim. Biophys. Acta 586, 231-241
- (36) Nimi O, Kiyohara H, Mizoguchi T, Ohata Y, Nomi R (1970) Agric. Biol. Chem. 34, 1150-1156
- (37) Teraoka H, Tanaka K (1974) J. Bact. 120, 316-321

- (38) Skinner RH, Cundliffe E (1982) J. Gen. Microbiol. 128, 2411-2416
- (39) Skinner RH, Cundliffe E, Schmidt FJ (1983) J. Biol. Biochem. 258, 12702-12706
- (40) Graham MY, Weisblum B (1979) J. Bacteriol. 137, 1464-1467
- (41) Fujisawa Y, Weisblum B (1981) J. Bacteriol. 146, 621-631
- (42) Lai CJ, Weisblum B (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 856-860
- (43) Lai CJ, Weisblum B, Fahnestock SR, Nomura M (1973) J. Mol. Biol. 74, 67-72
- (44) Cundliffe E (1978) Nature 272, 792-795
- (45) Cundliffe E, Thompson J (1979) Nature 278, 859-861
- (46) Thompson J, Schmidt F, Cundliffe E (1982) J. Biol. Chem. 257, 7915-7917
- (47) Helser TL, Davies J, Dahlberg JE (1971) Nature New Biology 233, 12-14
- (48) Helser TL, Davies J, Dahlberg JE (1972) Nature New Biology 235, 6-9
- (49) Piendl W, Böck A (1982) Antimicrob. Agents Chemother. 22, 231-236
- (50) Yamamoto H, Hotta K, Okami Y, Umezawa H (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 100, 1396-1401
- (51) Yamamoto H, Hotta K, Okami Y, Umezawa H (1981) J. Antibiot. 34, 824-829

- (52) Higgins CE, Kastner RE (1968) In: Antimicrob. Agents Chemother. 1967, 324-331
- (53) Nakamo MM, Mashiko H, Ogawara H (1984) J. Bacteriol. 157, 79-83
- (54) Hooper IR (1984) In: Aminoglycoside Antibiotics (Umezawa, Hooper IR, ed.), S. 1-37. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- (55) Davies J, Gorini L, Davis BD (1965) Mol. Pharmacol. 1, 93-106
- (56) Chang FN, Flaks JG (1972) Antimicrob. Agents Chemother. 2, 308-318
- (57) Schreiner G, Nierhaus KH (1973) J. Mol. Biol. 81, 71-82
- (58) Modolell J, Davis BD (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1148-1155
- (59) Wallace BJ, Davis BD (1973) J. Mol. Biol. 75, 377-390
- (60) Davis BD, Tai P-C, Wallace BJ (1974) In: Ribosomes, S. 771-789. Cold Spring Harbor Laboratory
- (61) Ozaki M, Mizushima S, Nomura M (1969) Nature 222, 333-339
- (62) Biswas DK, Gorini L (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2141-2144
- (63) Garvin RT, Biswas DK, Gorini L (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3814-3818

- (64) Misumi M, Nishimura T, Komai T, Tanaka N (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 358-365
- (65) Le Goffic F, Tangy F, Moreau B, Capmau M-L (1979) J. Antibiot. 32, 1288-1292
- (66) Davies J, Davis BD (1968) J. Biol. Chem. 243, 3312-3316
- (67) Tai P-C, Davis BD (1979) Biochemistry 18, 193-198
- (68) Kühberger R, Piepersberg W, Petzet A, Buckel P, Böck A (1979) Biochemistry 18, 187-193
- (69) Zierhut G, Piepersberg W, Böck A (1979) Eur. J. Biochem. 98, 577-583
- (70) Choi EC, Nishimura T, Tanaka N (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 755-762
- (71) Thorbjarnardóttir SH, Magnúsdóttir RA, Eggertsson G, Kagan SA, Andrésson OS (1978) Mol. Gen. Genet. 161, 89-98
- (72) Piepersberg W, Geyl D, Hummel H, Böck A (1980) In: Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosome (Osawa S, Ozeki H, Uchida H, Yura T, ed.), S. 359-377. University of Tokyo Press
- (73) Wagman GH, Weinstein MJ (1980) Ann. Rev. Microbiol. 34, 537-557
- (74) Hotta K, Saito N, Okami Y (1980) J. Antibiot. 33, 1502-1509
- (75) Hopwood DA, Kieser T, Wright HM, Bibb MJ (1953) J. Gen. Microbiol. 129, 2257-2269
- (76) Bachmann B (1972) Bact. Rev. 36, 525-557

- (77) Cundliffe E, Dixon P, Stark M, Stöffler G, Ehrlich R, Stöffler-Meilicke M, Cannon M (1979) J. Mol. Biol. 132, 235-252
- (78) Rosset R, Gorini L (1969) J. Mol. Biol. 39, 95-112
- (79) Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977) Biochem. 16, 4743-4751
- (80) Traub P, Nomura M (1969) J. Mol. Biol. 40, 391-413
- (81) Thompson J, Cundliffe E, Stark MJR (1982) J. Gen. Microbiol. 128, 875-884
- (82) Dijk J, Littlechild J (1979) In: Methods in Enzymology LIX, S. 481-502
- (83) Böck A, Petzet A, Piepersberg W (1979) FEBS Letters 104, 317-321
- (84) Hardy SJS, Kurland CG, Voynow P, Mora G (1969) Biochemistry 8, 2897-2905
- (85) Geyl D, Böck A, Isono K (1981) Mol. Gen. Genet. 181, 309-312
- (86) Schleifer KH, Kandler O (1969) Arch. Mikrobiol. 57, 335-365
- (87) Rhuland LE, Work E, Denman FR, Hoare DS (1955) J. Amer. Chem. Soc. 77, 4844-4846
- (88) Fiedler F, Schleifer KH, Cziharz B, Interschick E, Kandler O (1970) Publ. Fac. Sci. Univ. J.E. Purkyne Brno 47, 111-122

- (89) Albersheim P, Nevius DJ, English PD, Karr A (1967) Carbohydrate Res. 5, 340-345
- (90) Fiedler F, Schäffler MJ, Stackebrandt E (1981) Arch. Microbiol. 129, 85-93
- (91) Ehresmann B, Imbault P, Weil JH (1973) Anal. Biochem. 54, 454-463
- (92) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- (93) Goodfellow M, Orchard VA (1974) J. Gen. Microbiol. 83, 375-387
- (94) Valu G, Szabó G (1978) In: Genetics of Actinomycetales (Freerksen E, Tarnok J, Thumin JH, ed.), S. 409-413. Fischer-Verlag, Stuttgart
- (95) Kniep B, Griesebach H (1980) Eur. J. Biochem. 105, 139-144
- (96) Nomoto M, Narahashi Y (1959) J. Biochem. 46, 653-659
- (97) Skinner RH, Cundliffe E (1980) J. Gen. Microbiol. 120, 95-104
- (98) Mikulí K, Jiráňová A, Weiser J, Janda I, Šťastuň J (1983) Biochim. Biophys. Acta 740, 99-107
- (99) Baldacci E, Locci R (1961) Ann. Microbiol. Enzimol. 11, 19-30
- (100) Buckel P, Buchberger A, Böck A, Wittmann HG (1977) Mol. Gen. Genet. 158, 47-54

- (101) Shirafuji H, Kida M, Nogami I, Joneda M (1980) *Agri. Biol. Chem.* 44, 1561-1566
- (102) Nomura M, Held WA (1974) In: *Ribosomes* (Nomura M, Tissières A, Lengyel P, ed.), S. 193-224. Cold Spring Harbor
- (103) Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller HF (1983) *Microbiol. Rev.* 47, 621-669
- (104) Thompson J, Cundliffe E (1981) *J. Gen. Microbiol.* 124, 291-297
- (105) Gottlieb D (1974) In: *Actinomycetales* (Bachanan RE, Gibbons NE, ed.), S. 657-659. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8.ed.). The Williams & Wilkins Company, Baltimore
- (106) Schleifer KH, Kandler O (1972) *Bact. Rev.* 26, 407-477
- (107) Goodfellow M, Minnikin DE (1977) *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 159-180
- (108) Shirling EB, Gottlieb D (1976) In: *Actinomycetales: The Boundary Microorganisms* (Arai T, ed.), S. 9-42. University Park Press Baltimore, London, Tokyo
- (109) Hori H, Osawa S (1977) *J. Bacteriol.* 133, 1089-1095
- (110) Schmid G, Böck A (1982) *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* C3, 347-353
- (111) Lando D, Lousin MA, Ojasoo T, Raynaud J-P (1976) *Eur. J. Biochem.* 66, 597-606

- (112) Perzynski S, Cannon M, Cundliffe E, Chahwala SB, Davies J (1979) Eur. J. Biochem. 99; 623-628
- (113) Okuda T, Ito Y (1982) In: Aminoglycoside Antibiotics (Umezawa H, Hooper IR, ed.), S. 111-203. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- (114) Tanaka N (1982) In: Aminoglycoside Antibiotics (Umezawa H, Hooper IR, ed.), S. 221-266. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- (115) Tai P-C, Wallace BJ, Herzog EL, Davis BD (1973) Biochemistry 12, 609-613
- (116) Gorini L, Kataja E (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 656-663
- (117) Bollen A, Davies J, Ozaki M, Mizushima S (1969) Science 165, 85-86
- (118) Mark LG, Sigmund DC, Morgan EA (1983) J. Bacteriol. 155, 989-994
- (119) Okuyama A, Yoshikawa M, Tanaka N (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1163-1169
- (120) Dabbs ER (1978) J. Bacteriol. 136, 994-1001
- (121) Birge EA, Kurland CG (1969) Science 166, 1282-1284
- (122) Dabbs E, Wittmann HG (1976) Mol. Gen. Genet. 149, 303-309
- (123) Piepersberg W, Böck A, Wittmann HG (1975) Mol. Gen. Genet. 140, 91-100

- (124) Masukawa H (1969) J. Antibiot. 22, 612-622
- (125) Phoenix P, Melançon P, Brakier-Gingras L (1983) Mol. Gen. Genet. 189, 123-128
- (126) Li M, Tzagoloff A, Underbrink-Lyon K, Martin NC (1982) J. Biol. Chem. 257, 5921-5928
- (127) Campuzano S, Vázquez D, Modolell J (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 960-966
- (128) Stöffler G, Bald R, Kastner B, Lührmann R, Stöffler-Meilicke M, Tischendorf G (1979) In: Ribosomes (Chambliss G, Craven GR, Davies J, Davis K, Kahan L, Nomura M, ed.), S. 171-206. University Park Press, Baltimore
- (129) Akiyama T, Tanaka N (1981) J. Antibiot. 34, 763-769
- (130) Kenerly ME, Morgan EA, Post L, Lindahl L, Nomura M (1977) J. Bacteriol. 132, 931-938
- (131) Sigmund CD, Morgan EA (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5602-5606
- (132) Yamada T, Mizuguchi Y, Nierhaus KH, Wittmann HG (1978) Nature 275, 460-461
- (133) Wittmann HG, Stöffler G, Apirion D, Rosen L, Tanaka K, Tamaki M, Takata R, Dekio S, Otaka E, Osawa S (1973) Mol. Gen. Genet. 127, 175-189
- (134) Thompson J, Cundliffe E, Stark M (1979) Eur. J. Biochem. 98, 261-265

- (135) Wienen B, Ehrlich R, Stöffler-Meilicke M, Stöffler G, Smith I, Weiss D, Vince R, Pestka S (1979) J. Biol. Chem. 254, 8031-8041
- (136) Noreau J, Gris  -Miron L, Brakier-Gingras L (1980) Biochim. Biophys. Acta 608, 72-81
- (137) Gris  -Miron L, Noreau J, Melan  on P, Brakier-Gingras L (1981) Biochim. Biophys. Acta 656, 103-110
- (138) V  quez D (1975) In: Antibiotics (Corcoran JW, Hahn EF, ed.), S. 521-534. Springer-Verlag, Berlin
- (139) Dujon B (1980) Cell 20, 185-197
- (140) Kearsley SE, Craig JW (1981) Nature 290, 607-608
- (141) Dole  ilov   L, Sp   ek J, Vondr   ek M, Pele  kov   F, Van  k Z (1965) J. Gen. Microbiol. 39, 305-309
- (142) Woodruff HB (1974) Symp. Soc. Gen. Microbiol. 16, 22-46

Herrn Professor Dr. A. Böck möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine vielen hilfreichen Ratschläge und seine große Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Ganz besonders danken möchte ich ihm für die sehr intensive wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Eric Cundliffe, in dessen Labor ein Teil dieser Arbeit im Rahmen eines EMBO-Stipendiums entstanden ist, für seine Gastfreundschaft und die intensive wissenschaftliche Förderung.

Allen meinen Kollegen in München und Leicester möchte ich für zahlreiche Hinweise und Diskussionsbeiträge danken.

Frau Margit Geier möchte ich besonders herzlich danken für die Reinschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

25. April 1953 Geboren in München als erstes Kind von Rosa und Dr. Max Piendl
- 1959 - 1963 Besuch der Volksschule in Regensburg
- 1963 - 1972 Besuch des Albrecht-Altdorfer-Gymnasiums in Regensburg
- April 1973 -
August 1974 Zivildienst; abgeleistet beim Studentenwerk Regensburg
- November 1974 -
1980 Studium der Biologie an der Universität Regensburg
- Januar 1980 Abschluß des Studiums mit Erlangung des Diploms
- ab Oktober 1980 Arbeit an der Promotion in Mikrobiologie bei Professor Dr. A. Böck an der Ludwig-Maximilians-Universität München über das Thema "Mechanismus des Selbstschutzes von Aminoglykosid-Antibiotika produzierenden Actinomyceten". Betreuung von Anfänger- und Fortgeschritten-Praktikas.
1. März 1983 -
30. April 1983 Forschungsaufenthalt bei Dr. Eric Cundliffe am Department of Biochemistry der University Leicester, England, im Rahmen eines EMBO-Stipendiums.

